

**Lokalisierung und Charakterisierung
Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen bis zu 30 Tage nach
mechanischer und ischämischer Läsion des Gehirns**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologe

Tobias Stubbe

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Stefan Hecht, Ph.D.

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Hans-Dieter Volk
2. Prof. Dr. Birgit Sawitzki
3. Prof. Dr. Andreas Meisel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2013

Summary

The brain is an immune privileged organ that differs in immune reactivity to the peripheral immune system. After brain lesion local and peripheral immune responses are activated and autoreactive T cells specific against brain antigens are expanded, but no delayed autoimmune neuropathology evolves. Immune suppressive CD4⁺/Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) may have an important role in maintaining immune tolerance after brain lesion. This study sought to analyse the temporal distribution, location, induction and effect of Tregs on days 7, 14 and 30 following entorhinal cortex lesion (ECL) and cerebral infarction.

By using flow cytometry a strong accumulation of Tregs was detected in the lesioned area from Foxp3EGFP reporter mice at days 14 and 30 after ECL. Using immunohistochemistry Tregs were found in close cell-cell contact with MHCII⁺ microglia and macrophages at the lesion site. Due to the low amount of isolable T cells following ECL further studies were performed in mice after transient middle cerebral artery occlusion (MCAO), a model for ischemic stroke. A significant accumulation of Tregs and activated microglia occurred ipsilaterally in the brain at days 14 and 30 after MCAO compared with day 7. Macrophages and dendritic cells were found on days 7, 14 and 30. Compared with peripheral lymphatic organs and blood the proportion of Foxp3⁺ Tregs in the CD4⁺ population was significantly elevated. At days 7 and 14 about 60% of Tregs in the brain were positive for the proliferation marker Ki-67. By using immunohistochemistry Foxp3EGFP⁺ Tregs were found in direct cell-cell contact with MHCII⁺ dendritic cells and macrophages/microglia in the infarct area. We next asked if Foxp3⁺ Tregs are *de novo* induced from naïve CD4⁺ T cells after MCAO. In two different setups naïve CD45RB^{high}/CD4⁺ cells were isolated from lymphatic organs of Foxp3EGFP mice, carrying a wild type T cell receptor (TCR), or 2D2.Foxp3EGFP mice, carrying a TCR specific for myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), and were depleted of Foxp3EGFP⁺ Tregs. One day before MCAO naïve CD45RB^{high}/CD4⁺ cells were transferred into RAG1^{-/-} mice, which lack adult T and B cells. In this study no *de novo* induction of Foxp3EGFP⁺ Tregs from naïve CD4⁺ T cells was detected at day 14 after MCAO. To test the effect of Tregs in the context of a late immune response CD25⁺/Foxp3EGFP⁺ Tregs were depleted by intravenous injection of an antibody against CD25 (clone PC61) at day 3 after MCAO. After depletion no effects on lesion volumes and gait parameters were detected up to 27 days following MCAO compared with isotype-control.

The present study demonstrates a late expansion of Foxp3⁺ Tregs in the post-ischemic brain for the first time. Due to cell-cell contacts of Foxp3⁺ Tregs with MHCII in the brain

a local reactivation is feasible. In parallel a strong gene expression of molecules important for immune cell recruitment, tolerance induction and antigen presentation, were found in the brain. Nevertheless, Foxp3⁺/CD25⁺ Tregs were not relevant in suppressing inflammatory processes in the brain that affect lesion size and gait parameters in the late phase after MCAO. Further studies could elucidate the function of Tregs after neuronal lesion.

Zusammenfassung

Das Gehirn ist ein immunprivilegiertes Organ, welches sich in der Immunreaktivität von dem peripheren Immunsystem unterscheidet. Nach einer Verletzung des Gehirns werden lokale und periphere Immunantworten aktiviert. Langfristig kommt es jedoch trotz der verstärkten Bildung autoreaktiver T-Zellen gegen Gehirnproteine zu keiner ausgeprägten autoimmunen Neuropathologie. Eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung dieser Immuntoleranz haben möglicherweise immunsuppressorische $CD4^+/Foxp3^+$ regulatorische T-Zellen (Tregs). Aus diesem Grund wurden in dieser Studie die zeitliche Verteilung, Lokalisierung, Induktion und Wirkung von Tregs an den Tagen 7, 14 und 30 nach entorhinaler Kortexläsion (ECL) und ischämischem Infarkt untersucht.

Durchflusszytometrisch konnte in Foxp3EGFP Reportermäusen 14 und 30 Tage nach ECL eine starke Akkumulation von Tregs in der Läsion beobachtet werden. Immunhistochemisch wurden an der Läsionsstelle Tregs in direkten Zellkontakt mit $MHCII^+$ Mikroglia und Makrophagen beobachtet. Aufgrund der geringen Menge T-Zellen im Gehirn nach ECL wurden weitere Analysen in der Maus nach einem transienten Verschluss der mittleren Hirnarterie (MCAO), ein Modell für ischämischen Schlaganfall, durchgeführt. An den Tagen 14 und 30 nach MCAO wurde ipsilateral im Gehirn eine signifikante Akkumulation Tregs und aktivierter Mikroglia im Vergleich zu Tag 7 und den Kontrollen beobachtet. Makrophagen und dendritische Zellen konnten an den Tagen 7, 14 und 30 verstärkt im Gehirn detektiert werden. Im Vergleich zur Peripherie war der prozentuale Anteil $Foxp3^+$ Tregs in der $CD4$ -Population signifikant erhöht. An den Tagen 7 und 14 war im Gehirn mit ca. 60 % ein sehr hoher Anteil der Tregs positiv für den Proliferationsmarker Ki-67. Im Infarktgebiet wurden Tregs in direkten Zellkontakt mit $MHCII^+$ dendritischen Zellen und Makrophagen/Mikroglia nachgewiesen. Für den Nachweis einer *de novo* Induktion von Tregs wurden naive $CD45RB^{high}/CD4^+$ Zellen ohne $Foxp3EGFP^+$ Tregs in zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen aus lymphatischen Organen von Foxp3EGFP Mäusen, mit Wildtyp T-Zellrezeptoren (TCR), oder 2D2.Foxp3EGFP Mäusen, mit TCR spezifisch gegen Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein, isoliert. Die naiven $CD4^+$ Zellen wurden einen Tag vor MCAO in $RAG1^{-/-}$ Mäuse, welche keine adulten T- und B-Zellen besitzen, transferiert. Am Tag 14 nach MCAO war in keinem der Versuchsansätze in den $RAG1^{-/-}$ Mäusen eine *de novo* Induktion $Foxp3EGFP^+$ Tregs aus den naiven $CD4^+$ Zellen zu beobachten. Zur Untersuchung der Wirkung von Tregs wurden $CD25^+/Foxp3EGFP^+$ Tregs durch die i.v. Injektion eines Antikörpers gegen CD25 (Klon PC61) ab Tag drei nach MCAO depletiert. Bis zu 27 Tage nach MCAO konnten keine

Veränderungen in den Läsionsvolumina und in dem Gangverhalten gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden.

In dieser Studie wurde zum ersten Mal eine späte Expansion Foxp3⁺ Tregs im Gehirn nach Ischämie nachgewiesen. Der Zellkontakt der Tregs mit MHCII im lädierten Gehirn ermöglicht eine antigenspezifische Reaktivierung. Zeitgleich wurde eine erhöhte Genexpression immunologischer Moleküle, die wichtig für die Rekrutierung von Immunzellen, Induktion einer Immuntoleranz und Antigenpräsentation sind, nachgewiesen. CD25⁺/Foxp3EGFP⁺ Tregs waren jedoch nicht relevant für die Suppression inflammatorischer Prozesse im Gehirn, die Auswirkungen auf Läsionsvolumina und Gangverhalten zu späten Zeitpunkten nach MCAO haben. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Rolle der Tregs nach Verletzungen im Gehirn zu entschlüsseln.

Inhaltsverzeichnis

SUMMARY.....	III
ZUSAMMENFASSUNG	V
INHALTSVERZEICHNIS.....	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	X
1 EINLEITUNG	1
1.1 Grundlagen des Immunsystems.....	1
1.1.1 T-Zellen	2
1.1.2 Toleranzinduktion durch regulatorische T-Zellen	3
1.2 Das Gehirn als immunprivilegiertes Organ	5
1.2.1 Die Blut-Hirn-Schranke.....	6
1.2.2 Efferenter Arm des Immunsystems im Gehirn.....	8
1.2.3 Afferenter Arm des Immunsystems im Gehirn.....	8
1.3 Immunantworten nach einer Schädigung im Gehirn	9
1.3.1 Das Modell der entorhinalen Kortexläsion.....	9
1.3.1.1 Immunreaktivität residenter Zellen nach axonaler Läsion	10
1.3.1.2 Die Beteiligung peripherer Leukozyten nach axonaler Läsion	11
1.3.2 Ischämischer Schlaganfall.....	13
1.3.2.1 Immunantwort nach zerebraler Ischämie	14
1.3.2.1.1 Effekte der Immunantwort nach Ischämie	15
1.3.2.1.2 Systemische Immunantwort	16
1.4 Hypothese und Zielsetzung der Doktorarbeit.....	17
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Materialien für die Anwendung im Labor	19
2.1.2 Labor- und Messgeräte	21
2.1.3 Geräte, Substanzen und chirurgisches Werkzeug für <i>in vivo</i> Versuche....	22
2.1.4 Antikörper für Durchflusszytometrie	23
2.1.5 Antikörper für Immunhistochemie.....	24
2.1.5.1 Primärantikörper	25
2.1.5.2 Sekundärantikörper, Streptavidin und DAPI	25
2.1.6 Programme.....	26
2.2 Methoden	26
2.2.1 Mausstämme und Tierhaltung	26
2.2.2 Operative Technik der entorhinalen Kortexläsion.....	26
2.2.3 Operative Technik zum Verschluss der mittleren Gehirnarterie	27
2.2.4 Magnetresonanztomographie zur Analyse des Läsionsvolumens	28
2.2.4.1 Berechnung des Läsionsvolumens.....	28
2.2.5 Zelltransfer in RAG1 ^{-/-} Mäuse	30
2.2.5.1 Organentnahme und Verarbeitung	31
2.2.5.2 Sortierung naiver CD4 ⁺ T-Zellen und Ausschluss Foxp3EGFP ⁺ Tregs ..	32
2.2.5.3 Sortierung CD45R/B220 ⁺ B Zellen.....	33
2.2.5.4 Adoptiver Zelltransfer in RAG1 ^{-/-} Mäuse	34
2.2.6 Depletion CD25 ⁺ Tregs nach MCAO	35
2.2.6.1 Injektion des Antikörpers anti-CD25 und des Isotyps IgG1	35
2.2.6.2 Zellanalyse mit dem Durchflusszytometer.....	35
2.2.6.3 MRT zur Untersuchung der Läsionsvolumen	36
2.2.6.4 Ganganalyse	36

2.2.7	Durchflusszytometrie	37
2.2.7.1	Organentnahme	38
2.2.7.2	Zellgewinnung aus lymphatischen Organen	38
2.2.7.3	Zellgewinnung aus Blut	39
2.2.7.4	Zellgewinnung aus Gehirnproben	39
2.2.7.4.1	<i>Collagenase VIII zur chemischen Dissoziation</i>	40
2.2.7.5	Allgemeines Protokoll zur Färbung der Oberflächenmarker	40
2.2.7.6	Intrazelluläre Färbung gegen Foxp3 und Ki-67	41
2.2.7.7	Kontrollfärbungen für die Durchflusszytometrie	42
2.2.7.8	Messung am Durchflusszytometer	42
2.2.8	Immunhistochemie	42
2.2.8.1	Organentnahme und Kryokonservierung	42
2.2.8.2	Anfertigung der Kryoschnitte	43
2.2.8.3	Allgemeines immunhistochemisches Färbeprotokoll	43
2.2.8.4	Färbeprotokoll mit Antikörpern gegen CD4 und GFP	43
2.2.8.5	Färbeprotokoll mit Antikörpern gegen GFP, MHCII und Iba1	44
2.2.8.6	Färbeprotokoll mit Antikörpern gegen GFP, MHCII und CD11c	44
2.2.8.7	Färbeprotokoll mit Antikörpern gegen GFP, CD4 und Laminin	44
2.2.8.8	Kontrollfärbungen	44
2.2.8.9	Mikroskopie	45
2.2.9	TaqMan Real-Time PCR	45
2.2.9.1	Organentnahme	45
2.2.9.2	RNA-Isolation	45
2.2.9.3	Herstellung der komplementären DNA	46
2.2.9.4	TaqMan Real-Time PCR	46
2.2.9.5	Relative Quantifizierung mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode	48
2.2.10	Statistische Auswertung	48
3	ERGEBNISSE	49
3.1	Durchflusszytometrie nach entorhinaler Kortexläsion	49
3.1.1	CD4 ⁺ T-Zellen und Foxp3 ⁺ Tregs akkumulieren nach ECL im Gehirn	50
3.2	Immunhistochemie im Gehirn nach ECL	52
3.2.1	EGFP ⁺ Tregs und Iba1 ⁺ /MHCII ⁺ Zellen akkumulieren im Läsionsareal	53
3.3	Durchflusszytometrie der T-Zellen nach MCAO	53
3.3.1	CD4 ⁺ T-Zellen und Foxp3 ⁺ Tregs akkumulieren im Gehirn nach MCAO ..	54
3.3.2	Ein erhöhter Anteil CD4 ⁺ T-Zellen ist nach MCAO im Gehirn aktiviert	57
3.3.3	Ein erhöhter Anteil CD4 ⁺ T-Zellen ist positiv für Ki-67 nach Ischämie im Gehirn	58
3.3.4	Die Anzahl CD4 ⁺ T-Zellen ist in inguinalen LK und Milz nach MCAO vermindert	60
3.3.5	Verändertes TCR-V β -Repertoire auf CD4 ⁺ T-Zellen nach MCAO im Gehirn	61
3.4	Analyse der <i>de novo</i> Induktion von Tregs nach MCAO	62
3.4.1	Nach MCAO findet keine <i>de novo</i> Induktion von Tregs statt	63
3.5	Immunhistochemie der CD4⁺/Foxp3EGFP⁺ Tregs nach MCAO	64
3.5.1	CD4 ⁺ Zellen und Foxp3EGFP ⁺ Tregs wandern ins Infarktgebiet ein	64
3.5.2	Foxp3EGFP ⁺ Tregs proliferieren nach MCAO im Gehirn	65
3.6	Durchflusszytometrie der Makrophagen, dendritischen Zellen und Mikroglia im Gehirn nach MCAO	66
3.6.1	Mikroglia akkumulieren in der ischämischen Hemisphäre und werden nach MCAO aktiviert	68
3.6.2	Dendritische Zellen und Makrophagen infiltrieren in das ischämische Gehirn	69

3.7	Immunhistochemie antigenpräsentierender Zellen nach MCAO	70
3.7.1	Zellkontakt antigenpräsentierender Zellen mit Tregs im Infarktgebiet.....	71
3.8	Expression immunologischer Moleküle nach MCAO im Gehirn	72
3.8.1	IL-2 wird im ischämischen Gehirn exprimiert.....	74
3.9	Funktionalität Foxp3EGFP⁺/CD25⁺ Tregs nach MCAO.....	75
3.9.1	Foxp3EGFP ⁺ /CD25 ⁺ Tregs sind nach Injektion des anti-CD25 reduziert ..	76
3.9.2	Läsionsvolumina nach anti-CD25 Injektion	76
3.9.3	Gangverhalten nach MCAO mit anti-CD25 Injektion	77
3.9.4	Infiltration der Immunzellen und Aktivierung der Mikroglia im ischämischen Gehirn nach anti-CD25 Injektion	79
3.9.5	Anti-CD25 Injektion führt zu einem verminderten Anteil aktivierter CD4 ⁺ T-Zellen.....	80
4	DISKUSSION.....	83
4.1	Immunantwort nach entorhinaler Kortextläsion.....	83
4.2	Immunantwort nach ischämischer Läsion.....	84
4.2.1	T-Zellen im Gehirn und in der Peripherie nach MCAO	85
4.2.1.1	Expansion Foxp3 ⁺ Tregs nach Ischämie im Gehirn	87
4.2.2	Der Einfluss antigenpräsentierender Zellen nach ischämischer Läsion	89
4.2.3	Expression immunologischer Moleküle nach ischämischer Läsion.....	90
4.2.4	Funktionalität CD25 ⁺ Tregs nach MCAO	92
4.3	Ausblick	94
5	LITERATUR.....	95
6	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	112
6.1	Abbildungsverzeichnis	112
6.2	Tabellenverzeichnis	114
7	ANHANG	115
7.1	Danksagung.....	115
7.2	Publikationen und Postervorträge.....	116
7.2.1	Publikationen	116
7.2.2	Postervorträge	116
7.3	Lebenslauf	117
7.4	Eidesstattliche Erklärung	119

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACC	<i>Arteria carotis communis</i>
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLS	Blut-Liquor-Schranke
BLMS	Blut-Leptomeninges-Schranke
CCL	C-C Chemokinligand
CCR	C-C Chemokinrezeptor
CD	Differenzierungsmarker
cDNA	komplementäre DNA
COX-2	Cyclooxygenase-2
CTLA-4	zytotoxisches T-Zell-assoziiertes Antigen-4
CXCR3	CXC-Chemokinrezeptor 3
DAMP	Gefahr-Assoziiertes molekulares Muster
DAPI	4',6-Diamidine-2'-Phenylindol Dihydrochlorid
DC-LAMP	<i>dendritic cell lysozyme-associated membrane glycoprotein</i>
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpMCAO	Tage nach MCAO
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ECL	entorhinale Kortextläsion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	verstärktes grünes fluoreszierendes Protein
FKS	fötales Kälberserum
FMO	Fluoreszenz-Minus-Eins
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Vorwärtsstreulicht
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFP	grünes fluoreszierendes Protein
GITR	Glucocorticoid-induzierter TNF-Rezeptor
h	Stunde
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
Iba1	ionisiertes Kalziumbindendes Adaptermolekül 1
ICAM-1	Interleukinadhäsionsmolekül-1
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
ILT3	Immunoglobulin-ähnliches Transkript 3
i.p.	<i>intraperitoneal</i>
IP-10	Interferon- γ -induziertes Protein-10
IFN- γ	Interferon- γ
LFA-1	Leukozyten Funktions-Antigen-1
LK	Lymphknoten
Lsg.	Lösung
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MHCI	Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse I
MHCII	Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse II
MBP	Myelin-Basisches Protein
MCAO	Verschluss der mittleren Gehirnarterie
MCP-1	Monozyten-Chemoattraktives Protein-1
min	Minuten

MIP-1 α	Makrophagen-inflammatorisches Protein-1 α
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomograph
NF-L	Neurofilament-L
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD-L1	programmierter Zelltod 1-Ligand-1
PLP	Proteolipid-Protein
RAG1	Rekombination-Aktivierungsgen-1
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rt-PA	gewebsspezifischer Plasminogenaktivator
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription-3</i>
SD	Standardabweichung
SNS	sympathisches Nervensystem
sog.	sogenannte
SSC	Seitwärtsstreulicht
TCR	T-Zellrezeptor
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Th-Zelle	T-Helferzelle
TLR	Toll-Like-Rezeptor
Tr1-Zelle	Typ-1 regulatorische T-Zelle
Tregs	regulatorische T-Zellen
u.a.	unter anderem
VCAM-1	Gefäßzellen-Adhäsionsmolekül-1
VEGF	Gefäßendothel-Wachstumsfaktor
VLA-4	Gefäßzellen-Adhäsionsmolekül-4
vs.	versus
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Das Gehirn besitzt ein Immunprivileg zum Schutz des Parenchyms vor potenziell schädigenden Einflüssen des Immunsystems (Cserr and Knopf, 1992). Nach einer Verletzung des Gehirns, wie zum Beispiel einem Gehirntrauma oder einem Schlaganfall, werden Immunzellen aktiviert und aus der Peripherie und dem Gehirn an die Läsionsstelle rekrutiert (Morganti-Kossmann et al., 2002; Wang et al., 2007). Zusätzlich führt eine Verletzung zu einer Öffnung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und Freisetzung lokaler Gehirnantigene in das Blut (Fagan and Gage, 1994; Yang and Rosenberg, 2011). Interessanterweise kommt es durch die Läsion und der darauf folgenden Immunreaktivität und Gegenwart autoreaktiver T-Zellen im Gehirn zu keiner autoimmunen Neuropathologie wie es bei einer Multiplen Sklerose zu beobachten ist (Kwidzinski et al., 2003). Möglicherweise wird nach einer Läsion im Gehirn die Immuntoleranz gegenüber Gehirnantigenen aktiv aufrechterhalten (Mutlu et al., 2006). Eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung dieser Immuntoleranz haben möglicherweise regulatorische T-Zellen (Tregs). Tregs sind eine Subpopulation der T-Zellen und besitzen stark immunsuppressorische Eigenschaften (Sakaguchi et al., 2009). Die Rolle der Tregs nach einer Läsion im Gehirn ist bislang noch unzureichend erforscht. Gerade zu späten Zeitpunkten, nach der ersten akuten Immunantwort im lädierten Gehirn, ist die Beteiligung autoreaktiver Tregs noch weitgehend ungeklärt.

1.1 Grundlagen des Immunsystems

Das Immunsystem besteht aus einer Reihe verschiedener Effektorzellen und Molekülen, welche den Körper vor Krankheitserregern und schädlichen Substanzen schützen. Die angeborene Immunabwehr wird sehr schnell nach dem Kontakt mit einem infektiösen Organismus aktiviert. Zellen der myeloiden Zelllinie, wie Makrophagen, dendritischen Zellen und Mastzellen, umfassen die meisten Zellen des angeborenen Immunsystems. Die Reaktion des adaptiven Immunsystems überlagert sich mit der angeborenen Immunabwehr, benötigt jedoch mehrere Tage, um sich zu entwickeln. Die adaptive Immunabwehr wird von Lymphozyten vermittelt, welche zwei Gruppen zuzuordnen sind: den B- und den T-Zellen. Die Lymphozyten besitzen Antigenrezeptoren an der Zelloberfläche, welche spezifisch gegen bestimmte Antigene auf Krankheitserregern sind und somit eine spezifische Immunantwort entwickeln können. Die Milliarden an Lymphozyten in einem Organismus besitzen insgesamt ein riesiges Repertoire an Antigenrezeptoren. Im gesunden Organismus ist die adaptive Immunantwort reaktiv gegenüber Fremdartigen, jedoch tolerant gegenüber körpereigenen Antigenen (Janeway and Murphy, 2009).

1.1.1 T-Zellen

T-Zellen entwickeln sich aus hämatopoietischen Stammzellen, die aus dem Knochenmark in den Thymus gewandert sind und dort durch positive und negative Selektion ein T-Zellrepertoire produzieren, welches Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) restriktiv ist (Starr et al., 2003; Stritesky et al., 2012). Die T-Zelle besitzt auf der Oberfläche T-Zellrezeptoren (TCR), welche mit den Immunglobulinen verwandt sind und spezifisch Antigene auf antigenpräsentierenden Zellen erkennen können. Wird ein Antigen von einer T-Zelle gebunden und erfolgt die notwendige Kostimulation wird diese aktiviert. Die T-Zellen lassen sich in drei Subgruppen unterteilen: zytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen (Th-Zellen) und Tregs (Janeway and Murphy, 2009).

Die zytotoxische T-Zelle ist eine Untergruppe der T-Zellen und wird gegen Zellen aktiv, die von Viren infiziert sind. Die zytotoxische T-Zelle gehört zur Klasse der $CD8^+$ Zellen. Durch den Korezeptor CD8 bindet es bei einer Antigenerkennung über den TCR bevorzugt den Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse I (MHCI). Wird eine Zelle des Körpers mit einem Virus infiziert, produziert sie virale Proteine, welche im endoplasmatischen Reticulum an MHCI Moleküle gebunden werden. Die MHCI Moleküle mit den gebundenen Viruspeptiden werden an die Oberfläche transportiert und können anschließend spezifisch $CD8^+$ T-Zellen aktivieren, welche sich zu einer reifen zytotoxischen T-Zelle entwickeln (Janeway and Murphy, 2009).

Naive $CD4^+$ T-Zellen tragen den Korezeptor CD4 an der Oberfläche und binden dadurch bevorzugt den Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse II (MHCII). Dieses wird von den antigenpräsentierenden Zellen exprimiert. In den peripheren lymphatischen Organen können dendritische Zellen phagozytierte Antigene über das MHCII Molekül präsentieren und mit einer Kostimulation die Umwandlung naiver $CD4^+$ Zellen in reife und ausdifferenzierte Th-Zellen bewirken (Janeway and Murphy, 2009). Die Th-Zellen werden anhand der Expression von unterschiedlichen Zytokinen in weitere Subgruppen unterteilt. Die Th1-Zellen exprimieren hauptsächlich Interferon- γ ($IFN-\gamma$) und Interleukin (IL)-2, deren Funktion die Aktivierung von Makrophagen am Inflamationsherd ist. Th1-Zellen sind wichtig für die Verteidigung vor intrazellulären Pathogenen. IL-4, IL-5 und IL-13 sind spezifische Zytokine der Th2-Zellen. Den Th2-Zellen werden sehr unterschiedliche Funktionen zugeschrieben. Sie sind zum Beispiel essentiell für die Beseitigung extrazellulärer Organismen und Parasiten, wie zum Beispiel Helminthen. Eine weitere Subgruppe der Th-Zellen sind die Th17-Zellen. Diese sekretieren IL-17, induzieren die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine und begünstigen dadurch Inflammation und die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten an den Inflamationsherd (Abb. 1; Fabbri et al., 2003; Jäger and Kuchroo, 2010).

1.1.2 Toleranzinduktion durch regulatorische T-Zellen

Damit periphere Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen gewährleistet werden kann, muss die Expansion und Aktivierung autoreaktiver T-Zellen, die nicht im Thymus über negative Selektion aussortiert wurden, aktiv supprimiert werden (Palmer, 2003). Eine spezialisierte Subgruppe der T-Zellen, die Tregs, vermittelt durch antigenspezifische Immunsuppression die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz (Benacerraf and Germain, 1981). Es lassen sich unterschiedliche Typen Tregs beschreiben, welche aus naiven $CD4^+$ T-Zellen in der Peripherie induziert werden können. Typ-1 regulatorische T-Zellen (Tr1-Zellen) können in der Gegenwart von IL-10 und gleichzeitiger Antigenstimulation generiert werden und über die Sekretion von IL-10 und transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β) Immunantworten antigenspezifisch inhibieren (Groux et al., 1997). Th3-Zellen sind eine weitere Gruppe Tregs, welche nach oraler Toleranzinduktion mit Antigenen über die Sekretion von TGF- β suppressorisch wirken können (Abb. 1; Weiner, 2001).

Neben diesen in der Peripherie induzierten Tregs gibt es eine Gruppe Zellen, die während der frühen Entwicklung eines Individuums aus $CD4^+/CD8^-$ α/β TCR-positiven Zellen im Thymus entstehen und den Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein P3 (Foxp3) exprimieren. Foxp3 ist kritisch für die Differenzierung und Funktion dieser als natürlich vorkommende Tregs bezeichnete Zellgruppe (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003; Ouyang et al., 2010). Die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 ist ebenfalls wichtig für die Entwicklung induzierter Tregs in der Peripherie, welche nicht zu den Tr1-Zellen und Th3-Zellen gehören. Induzierte Foxp3 $^+$ Tregs können in der Gegenwart von TGF- β , IL-2 und Retinsäure aus naiven $CD4^+/CD25^-$ T-Zellen entstehen (Abb. 1; Chen et al., 2003; Coombes et al., 2007; Zheng et al., 2007). Der Transkriptionsfaktor Foxp3 wurde als Schlüsselfaktor für die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz identifiziert. Eine Mutation im humanen Gen FOXP3 ist die Ursache für das IPEX (Immundysregulation-Polyendokrinopathie-Enteropathie-X)-Syndrom (Ochs et al., 2005). Eine Mutation im Foxp3-Gen der *Scurfy*-Maus führt zu Bildung hyperaktiver $CD4^+$ T-Zellen und Überproduktion proinflammatorischer Zytokine und ist innerhalb eines Monats nach Geburt letal (Brunkow et al., 2001).

Die Transduktion des Foxp3 führt in naiven $CD4^+$ T-Zellen zur Expression von CD25, der α -Kette des IL-2 Rezeptors (Hori et al., 2003). CD25 wurde lange vor der Entdeckung des Transkriptionsfaktors Foxp3 als Marker für die Identifizierung von $CD4^+$ Tregs verwendet (Sakaguchi et al., 1995). In der Maus ist ein Teil der Foxp3 $^+$ Tregs negativ für den Marker CD25. Es konnten jedoch, sowohl bei den CD25 $^+$ /Foxp3 $^+$ Tregs als auch bei den CD25 $^-$ /Foxp3 $^+$ Tregs, eine immunsuppressorische Aktivität nachgewiesen werden (Fontenot et al., 2005a; Sakaguchi et al., 2006). Im Menschen

Einleitung

konnten Unterschiede in Funktion und phänotypischen Merkmalen der Foxp3⁺ Tregs im Vergleich zur Maus festgestellt werden (Miyara and Sakaguchi, 2011). Unter anderem besitzt der Mensch eine Subpopulation Foxp3⁺ Tregs die nicht immunsuppressiv ist (Miyara et al., 2009).

Foxp3 führt zur Expression verschiedener Tregs-assoziiierter Moleküle, wie zytotoxisches T-Zell-assoziiertes Antigen-4 (CTLA-4) und Glucocorticoid-induzierter TNF-Rezeptor (GITR) (Hori et al., 2003). Zusätzlich führt es in der Zelle zur Repression der Produktion von IL-2, IFN- γ und IL-4 (Hori et al., 2003). Die Exposition gegenüber dem Zytokin IL-2, welches Exogen zur Verfügung gestellt werden muss, ist für die fortwährende Expression des Foxp3 und CD25 in natürlich vorkommenden Tregs notwendig (Fontenot et al., 2005b; Shevach et al., 2006). Für die Entwicklung Foxp3⁺ Tregs im Thymus ist die Signaltransduktion über IL-2 und dem IL-2 Rezeptor jedoch nicht relevant (Fontenot et al., 2005b). IL-2 verstärkt die immunsuppressive Funktion Foxp3⁺ Tregs in der Peripherie und führt in hoher Dosierung zu deren Proliferation (Fontenot et al., 2005b; Setoguchi et al., 2005; Shevach et al., 2006).

In drainierenden Lymphknoten (LK) präsentieren dendritische Zellen den Foxp3⁺ Tregs körpereigene Antigene (Scheinecker et al., 2002). Die aktivierten Foxp3⁺ Tregs expandieren und exprimieren eine Reihe von Homing-Rezeptoren (siehe Übersicht in Huehn and Hamann, 2005). Zu denen gehören Rezeptoren für Chemokine, wie der Rezeptor C-C Chemokinrezeptor Typ 7 (CCR7), und Adhäsionsmoleküle (Huehn et al., 2004; Siegmund et al., 2005). Ein Teil der Foxp3⁺ Tregs exprimiert das Adhäsionsmolekül CD103, welches mit dessen Ligand E-Cadherin auf Epithelzellen interagiert. Ein großer Teil der Tregs exprimiert CD62L, welches mit Molekülen des Gefäßendothels in den LK interagiert. Die Expression unterschiedlicher Homing-Rezeptoren kontrolliert den Transport und die Lokalisierung und somit die Kompartimentierung der Tregs-vermittelten Immunantwort (Huehn et al., 2004; Sakaguchi et al., 2008; Siegmund et al., 2005).

Zu den Mechanismen der Immunsuppression durch Foxp3⁺ Tregs gehören: die Sekretion der immunsuppressiven Zytokine IL-10 und TGF- β , Zellkontakt abhängige Suppression und Modifikation oder Tötung von antigenpräsentierenden Zellen (siehe Übersicht in Sakaguchi et al., 2008).

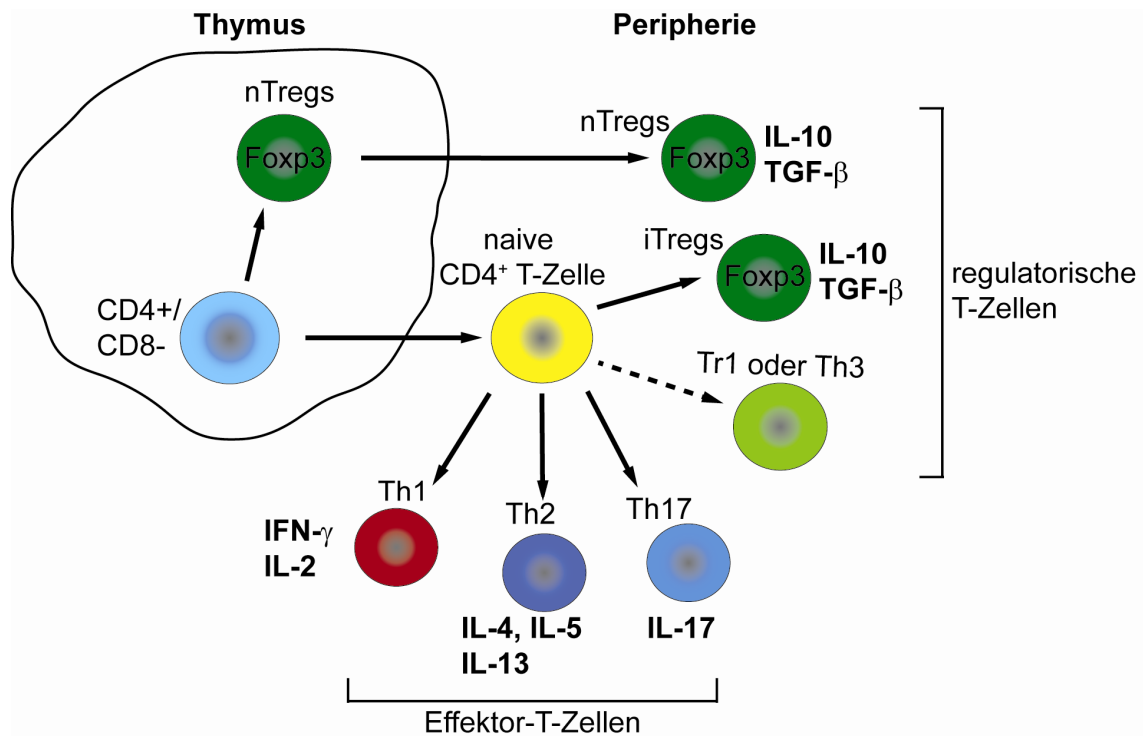


Abb. 1: Differenzierung unreifer CD4⁺/CD8⁻ Zellen und naiver CD4⁺ T-Zellen in regulatorische T-Zellen (Tregs) und Effektor-T-Zellen. Dargestellt sind Foxp3⁺ und Foxp3⁻ Tregs, sowie Effektor-T-Zellen (Th1, Th2 und Th17), die in peripheren lymphatischen Organen aus naiven CD4⁺ T-Zellen entstehen. Zusätzlich sind für die T-Zellgruppen charakteristische Zytokine aufgeführt. nTregs = natürliche Tregs, iTregs = induzierbare Tregs. Modifizierte Abbildung aus Sakaguchi et al. (2008).

1.2 Das Gehirn als immunprivilegiertes Organ

In Organen mit Immunprivileg findet eine verzögerte Abstoßung von Transplantaten durch das Immunsystem statt. Dieses Phänomen lässt sich in unterschiedlichen Organen, wie zum Beispiel im Auge, Gehirn und Hoden beobachten (Streilein, 1995). Der immunologische Sonderstatus des parenchymalen Gewebes im Gehirn wurde erstmals entdeckt, als nach einer Xenotransplantation von allogenetischen Tumorzellen eine ungehinderte Vermehrung im Gehirn stattfand, jedoch diese nach einer Transplantation in andere Organe abgestoßen wurden (Shirai, 1921). Seit dieser Beobachtung wurden in zahlreichen Studien die molekularen und zellulären Mechanismen, welche dem Immunprivileg im Gehirn zu Grunde liegen, erforscht. Das Immunprivileg des Gehirns wird als eine evolutionäre Adaptation gesehen, welche zum Schutz der neuronalen Netzwerke mit schwacher Regenerationsfähigkeit vor schädigenden Einflüssen des Immunsystems dient (Lotan and Schwartz, 1994). Es wurde ursprünglich angenommen, dass lediglich unter pathologischen Bedingungen eine Migration von Leukozyten in das Gehirn stattfindet und dass neuronales Gewebe vom Immunsystem im gesunden Zustand „ignoriert“ wird (Medawar, 1948). In dem klassischen Konzept des Gehirns als immunprivilegiertes Organ wird der BHS eine wesentliche Rolle zugeschrieben, indem diese die Isolation der Antigene im Gehirn

bewerkstelligt und periphere Immunzellen unter physiologischen Bedingungen an der Migration in das Parenchym hindert (Medawar, 1948). Die Definition des Immunprivilegs im Gehirn hat sich im Laufe der Zeit wesentlich verändert. Das Immunprivileg des Gehirns ist kein absoluter Zustand und es konnte gezeigt werden, dass fortwährend eine aktive und regulierte Kommunikation zwischen dem gesunden Gehirn und dem Lymphsystem stattfindet (Schwartz, 2003).

1.2.1 Die Blut-Hirn-Schranke

Die BHS ist eine protektive Barriere zwischen dem neuronalen Parenchym und dem Blut. Weitere Barrieren im Zentralnervensystem (ZNS) sind die Blut-Leptomeningeale Schranke (BLMS) in den Meningen des Gehirns und des Rückenmarks und die Blut-Liquor-Schranke (BLS) im *Plexus choroidei* (Engelhardt and Ransohoff, 2012). Eine erste Barriere für Serumbestandteile und Immunzellen bilden die Gefäßendothelzellen, welche über *Tight junctions* verbunden sind und somit den parazellulären Zugang in das Gehirn beschränken (Wolburg and Lippoldt, 2002). Die Endothelzellen sezernieren die endotheliale Basalmembran, welche in den Kapillaren direkt an der parenchymalen Basalmembran anliegt. Die Endfüße der Astrozyten umschließen die Gefäße und bilden gemeinsam mit der parenchymalen Basalmembran die *Glia limitans*. Die *Glia limitans* stellt eine zweite Barriere für Immunzellen dar und wird nur während einer Inflammation des ZNS von peripheren Immunzellen passiert (Engelhardt and Ransohoff, 2012). Im Gegensatz zu den Kapillaren teilen sich in den postkapillären Venolen die beiden Basalmembranen auf und bilden einen perivaskulären Raum, der mit Zerebrospinalflüssigkeit gefüllt ist (Engelhardt and Sorokin, 2009). In dem perivaskulären Raum befinden sich antigenpräsentierende Zellen, welche das ZNS überwachen (siehe Abb. 2; Hickey, 2001; Hickey and Kimura, 1988).

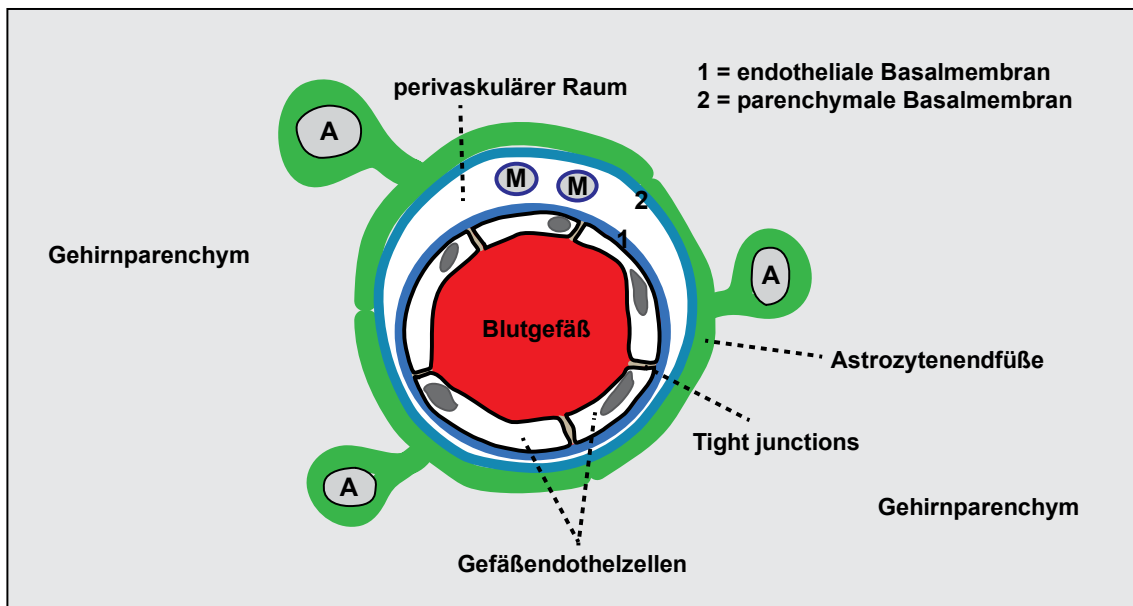


Abb. 2: Querschnitt durch eine postkapilläre Venole im Gehirn. Die Gefäßendothelzellen sind über *Tight junctions* verbunden und sezernieren die endotheliale Basalmembran (1). In den postkapillären Venolen befindet sich zwischen der endothelialen Basalmembran und der parenchymalen Basalmembran (2) ein perivaskulärer Raum, welcher mit Zerebrospinalflüssigkeit gefüllt ist. Antigenpräsentierende Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen (M), halten sich im perivaskulären Raum auf und überwachen das Gehirnparenchym. Die Endfüße von Astrozyten (A) umgeben das Gefäß und bilden mit der parenchymalen Basalmembran die *Glia limitans*. Modifizierte Abbildung aus Bechman et al. (2007).

Die Passage der Immunzellen durch das Gefäßendothel und durch die *Glia limitans* sind zwei unterschiedlich regulierte Vorgänge. Eine Rekrutierung von aktivierten Lymphoblasten wird in der BHS über eine Interaktion des $\alpha 4$ -Integrins mit Gefäßzellen-Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) vermittelt. $\alpha 4$ -Integrin wird auf Lymphoblasten exprimiert und VCAM-1 wird konstitutiv in kleinen Mengen auf Gefäßendothelzellen des Gehirns exprimiert (Vajkoczy et al., 2001). Weitere wichtige Moleküle für die Extravasation der T-Zellen sind Leukozyten Funktions-Antigen-1 (LFA-1) auf T-Zellen und Interleukinadhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) auf dem Gefäßendothel (Laschinger et al., 2002; Xu et al., 2003). Die Passage der Immunzellen in den perivaskulären Raum ist nicht notwendigerweise pathologisch. Für die Entstehung einer Neuropathologie müssen aktivierte T-Zellen die *Glia limitans* passieren. Dazu ist eine antigenspezifische Aktivierung durch Makrophagen im perivaskulären Raum notwendig (Tran et al., 1998). Durch die Freisetzung von Matrix-Metalloproteinase (MMP)-2 oder MMP-9 werden Dystroglykane, die Ankerproteine von Laminin 1 und 2 der parenchymalen Basalmembran, gespalten, wodurch eine Migration von T-Zellen in das Parenchym ermöglicht wird (Agrawal et al., 2006; Toft-Hansen et al., 2006).

1.2.2 Efferenter Arm des Immunsystems im Gehirn

Aktivierte T-Zellen infiltrieren auch vor dem Ausbruch eines wahrnehmbaren pathologischen Zustandes in das Gehirn (Flügel et al., 2001; Hickey et al., 1991). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass für den Eintritt der Lymphozyten in das Gehirn eine vorherige Aktivierung notwendig war, welche unabhängig von der Antigenspezifität, des T-Zellphänotyps und der MHC-Restriktion stattfand (Hickey et al., 1991). Tregs können nach einer viralen Infektion des ZNS zur Abminderung der schädigenden Inflammation im Gehirn beitragen, während die zielgerichtete antivirale Immunität im Gehirn bestehen bleibt. Tregs inhibieren die Proliferation von ZNS-reaktiven CD4⁺ T-Zellen in den drainierenden LK und führen zu einer Verminderung der Expression des CXC-Chemokinrezeptor 3 (CXCR3), ein für die Migration wichtiger Chemokinrezeptor, auf T-Zellen (Cervantes-Barragán et al., 2012).

Im Parenchym des Gehirns findet in vielfältiger Weise eine Regulation der Immunantwort und Inflammation statt. Gehirnzellen können den Fas-Ligand (CD95L) exprimieren, welcher in Fas (CD95)-Positiven T-Zellen nach dem Übertritt in das Parenchym Apoptose einleitet (Bechmann et al., 1999). Neurone können außerdem TGF- β sekretieren und Effektor-T-Zellen in Tregs konvertieren, welche wiederum den Prozess der Neuroinflammation, wie bei einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), unterbinden können (Liu et al., 2006). Astrozyten können ebenfalls Tregs induzieren (Trajkovic et al., 2004). Nach einer milden Stimulation *in vitro* mit IFN- γ regulieren Mikroglia den Rezeptor MHCII hoch und phagozytieren hinzugefügtes Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), ein Peptid des Myelins. Die beladenen und aktivierten Mikroglia konvertierten naive CD4⁺ Responder-Zellen in MOG-spezifische Tregs (Ebner et al., *submitted*). Leukozyten, welche aus der Peripherie in das Parenchym infiltrieren, treffen zunächst auf eine immunsuppressive Umgebung. Die Expression des MHCII auf Mikroglia reicht nicht aus, um eine primäre Immunantwort hervorzurufen und kann zu einer Apoptosis autoreaktiver T-Zellen führen. Dies wiederum kann dazu führen, dass sich Pathogene unbemerkt im ZNS ausbreiten. Mikroglia können jedoch nach dem Beginn einer Inflammation im ZNS die sekundäre Immunantwort unterstützen (Hugh Perry, 1998).

1.2.3 Afferenter Arm des Immunsystems im Gehirn

Der afferente Arm einer Immunantwort beinhaltet die Präsentation von Antigenen zu naiven T-Zellen und deren Aktivierung. Über den afferenten Arm gelangen gelöste Antigene in die drainierenden LK und in die Milz. In der Peripherie können Antigene durch antigenpräsentierende Zellen, wie zum Beispiel durch dendritische Zellen, zu den peripheren lymphatischen Organen transportiert werden. Die, mit dem Antigen beladenen, dendritischen Zellen können dann wiederum in den LK T-Zellen stimulieren

(Janeway and Murphy, 2009). Antigene können auch in gelöster Form über die Drainage der Lymphe zu den lymphatischen Organen transportiert und lokal von reifen dendritischen Zellen aufgenommen werden, welche dann naive T-Zellen aktivieren (Galea et al., 2007). Durch den Abfluss gelöster Gehirnantigene über die Zerebrospinalflüssigkeit in das Blut des duralen Sinus und über kraniale Nerven in die Lymphe ist der Kontakt des Gehirnparenchyms zu den zervikalen LK und der Milz gewährleistet (Cserr and Knopf, 1992). In diesem Zusammenhang konnte in einer Studie gezeigt werden, dass nach einer Injektion von radiomarkierten Albuminen in den *Nucleus caudatus* diese in die tiefen zervikalen LK abfließen (Yamada et al., 1991). In weiteren Versuchen wurde gezeigt, dass nach einer Injektion von Antigenen in das Gehirnparenchym es in den zervikalen LK zur spezifischen Bildung von Antikörpern kommt ohne die Entwicklung einer zytotoxischen T-Zellantwort (Harling-Berg et al., 1999). Im Gehirn findet nach der Injektion von grün fluoreszierendem Protein (GFP) exprimierenden Monozyten an eine mechanisch induzierte Läsionsstelle in der entorhinalen Kortex eine Migration der injizierten Zellen über den olfaktorischen Nerv und der Abfluss in die drainierenden tiefen zervikalen LK statt (Kaminski et al., 2012). Jedoch konnte bislang nicht der direkte Abtransport von Antigenen durch antigenpräsentierende Zellen aus dem ZNS in die Peripherie gezeigt werden.

1.3 Immunantworten nach einer Schädigung im Gehirn

Nach einer Schädigung des Gehirns, wie bei einem Gehirntrauma oder Schlaganfall, verändert sich das Immungeschehen im neuronalen Gewebe. Die Läsion des neuronalen Gewebes führt immunologisch zu einer neuen Situation im Organismus, worauf dieser reagiert und vermutlich versucht Folgeschaden von dem Gehirn abzuwenden. Abhängig vom Ausmaß der Schädigung variiert die Qualität der daraus resultierenden Immunantwort. Die Analyse der Immunantwort nach einer Schädigung des Gehirns wurde in dieser Doktorarbeit an den Modellen der entorhinalen Kortextläsion (ECL) und des Verschlusses der mittleren Gehirnarterie (MCAO), einem Modell für ischämischen Schlaganfall, vorgenommen.

1.3.1 Das Modell der entorhinalen Kortextläsion

Der entorhinale Kortex projiziert über den *Tractus perforans* in den *Gyrus dentatus* und liefert den wesentlichen Input der Hippocampusformation. Neurone aus dem medialen entorhinalen Kortex projizieren in die mittlere Molekularschicht und Neurone aus dem lateralen entorhinalen Kortex in die äußere Molekularschicht des *Gyrus dentatus*. Zusätzlich projiziert die entorhinale Kortex in die CA1 und CA3 Regionen des Ammon's Horn und in den Subikulum (siehe Abb. 3; Kandel et al., 2000). In dem Tiermodell der entorhinalen Kortextläsion (ECL) wird die Verbindung des entorhinalen Kortex über den

Einleitung

Tractus perforans mit dem Hippocampus mechanisch oder elektrolytisch durchtrennt (siehe Abb. 3). Die ECL wurde ursprünglich zur Untersuchung degenerativer und regenerativer Prozesse im ZNS entwickelt (Lynch et al., 1972). Nach einer Durchtrennung des *Tractus perforans* kommt es zu einer anterograden Degeneration entorhinaler Axone, welche in der Molekularschicht des *Gyrus dentatus* terminieren und es findet eine komplexe Reorganisation der neuronalen Verbindungen im deafferenzierten Hippocampus statt (Marrone et al., 2004; Matthews et al., 1976; Steward and Vinsant, 1983).

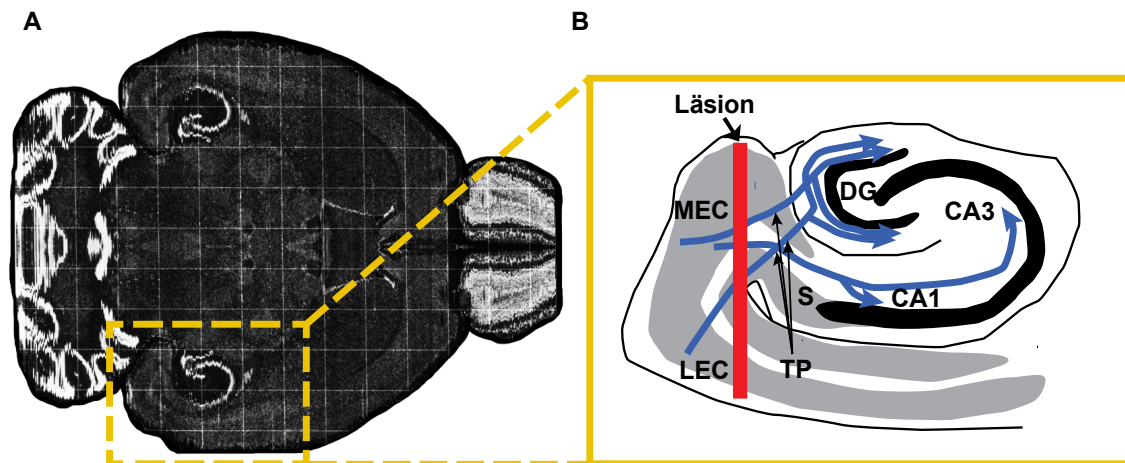


Abb. 3: Verbindung der entorhinalen Kortex mit der Hippocampusformation. (A) Horizontalschnitt durch das Mausgehirn zur Übersicht. Modifiziert aus: ©2012 Allen Institute for Brain Science. Allen Mouse Brain Atlas [Internet]. Verfügbar auf: <http://mouse.brain-map.org/>. (B) Schematische Darstellung eines Horizontalschnitts der entorhinalen Kortex und der über den Tractus perforans innervierten Bereiche der Hippocampusformation. Bei der entorhinalen Kortexläsion wird der *Tractus perforans* elektrolytisch oder mechanisch durchtrennt. DG = Gyrus dentatus, CA1 und CA3 = Regionen des Ammon's Horn, LEC = laterale entorhinale Kortex, MEC = mediale entorhinale Kortex, S = Subikulum, TP = Tractus perforans.

1.3.1.1 Immunreaktivität residenter Zellen nach axonaler Läsion

Mikroglia, die residenten Immunzellen im Gehirn, werden als erste Verteidigungslinie der angeborenen Immunabwehr im ZNS betrachtet und erfüllen wichtige Aufgaben nach einer Läsion im ZNS (Napoli and Neumann, 2009). Gemeinsam mit den Mikroglia tragen Astrozyten erheblich zur Beseitigung der durchtrennten Nervenfasern nach einer ECL bei und verursachen durch Phagozytoseaktivität eine anterograde Degeneration der durchtrennten Axone, welche aus dem entorhinalen Kortex im Hippocampus terminieren (Bechmann and Nitsch, 1997a). Eine Blockade der Aktivierung von Mikroglia nach Läsion führt zur Reduzierung sekundärer Schädigung des Gehirns und zu einem verstärkten regenerativem Wachstum von Neuriten (Eyüpoglu et al., 2003).

Bereits Stunden nach einer ECL sind im deafferenzierten Gebiet proliferierende Gliazellen (Gall et al., 1979) und innerhalb eines Tages eine erhöhte Anzahl Mikroglia

zu sehen (Fagan and Gage, 1990). Am Tag 3 ist in der denervierten Molekularschicht des *Gyrus dentatus* und in der Körnerzellschicht eine hohe Proliferationsrate der Mikroglia zu sehen, welche bis Tag 30 wieder abnimmt (Hailer et al., 1999). Nach ECL kommt es auf Mikroglia zu einer Expression der Adhäsionsmoleküle LFA-1, Gefäßzellen-Adhäsionsmolekül-4 (VLA-4) und ICAM-1 (Hailer et al., 1997) und findet eine Migration der Mikroglia in das Läsionsgebiet statt (Rappert et al., 2004). Zeitgleich lässt sich ein Anstieg des proinflammatorischen Zytokins IL-1 sehen (Fagan and Gage, 1990) und wird MHC I vermehrt auf Mikroglia exprimiert (Jensen et al., 1997). Für die Rekrutierung von Mikrogliazellen an das denervierte Gebiet ist die Signaltransduktion über den Rezeptor CXCR3 wichtig (Rappert et al., 2004). CXCR3 ist ein spezifischer Rezeptor für den Liganden Interferon- γ -induziertes Protein-10 (IP-10), welcher nach einer ECL verstärkt im lädierten Hippocampus exprimiert wird (Babcock et al., 2003). Ebenfalls regulieren Mikroglia bis zu 90 Tage nach ECL den Rezeptor zur Antigenpräsentation MHC II und den Co-Rezeptor B7-2 hoch, jedoch nicht B7-1 (Bechmann et al., 2001). B7-Moleküle sind essentiell für die T-Zellstimulierung und deren Abwesenheit verursacht T-Zellanergie (Matzinger, 1994). Im Modell der EAE führt die Kostimulation durch B7-1 zu einer destruktiver T-Zellantwort im ZNS, wohingegen die Kostimulation durch B7-2 protektiv wirkt (Karandikar et al., 1998; Racke et al., 1995).

Bei den Astrozyten lässt sich ein Maximum in der Proliferationsrate am Tag 7 und ein Maximum in der Anzahl am Tag 30 sehen (Hailer et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass im denervierten Gebiet in den ersten 10 Tagen nach ECL der Rezeptor Fas (CD95) und der Fas-Ligand (CD95L) auf Astrozyten hochreguliert werden (Bechmann et al., 2000). Der Fas-Ligand kann über den Rezeptor Fas Apoptose induzieren (Nagata and Golstein, 1995). Nach ECL war keine erhöhte Apoptose der Astrozyten zu sehen (Bechmann et al., 2000). Die Astrozyten können jedoch über die Ausschüttung des Fas-Ligand die Apoptose bei T-Zellen einleiten (Trajkovic et al., 2004). Auf Astrozyten wurde nach ECL eine erhöhte Expression des programmierten Zelltod-1-Ligand-1 (PD-L1), ein potenter Inhibitor von Effektor-T-Zellen, detektiert (Lipp et al., 2007).

1.3.1.2 Die Beteiligung peripherer Leukozyten nach axonaler Läsion

Durch die Öffnung der BHS kommt es in der ersten Woche nach ECL zu einem Ausfluss des Immunglobulins G (IgG) aus dem Blut in die Läsion und den Hippocampus. Zusätzlich kann nach intravenöser Injektion von Meerrettichperoxidase und Evans Blau eine Anfärbung an der mechanischen Läsion, jedoch nicht in den Bereichen mit anterograder Degeneration, beobachtet werden (Jensen et al., 1997). Interessanterweise lässt sich eine Infiltration peripherer Monozyten in das Parenchym

in Bereichen mit anterograder Degeneration beobachten, an denen keine Durchlässigkeit für Evans Blau beobachtet wurde (Bechmann et al., 2005; Jensen et al., 1997). Folglich erfolgt eine aktive Rekrutierung peripherer Leukozyten in Arealen anterograder Degeneration nach ECL.

Eine Problematik der mikroskopischen Charakterisierung von Mikroglia nach einer Läsion im ZNS ist, dass Makrophagen aus dem Blut in das Parenchym einwandern und sich anhand phänotypischer Merkmale nur schwer von den Mikroglia unterscheiden lassen. Mit dem Marker CD45 lassen sich jedoch Mikroglia, welche CD45^{low} exprimieren, von den Makrophagen, welche CD45^{high} exprimieren, am Durchflusszytometer unterscheiden. Durchflusszytometrisch ließ sich somit in einer Studie die Infiltration von CD11b⁺/CD45^{high} Makrophagen 12 h nach einer ECL nachweisen (Babcock et al., 2003). In einer weiteren Studie ließ sich die Infiltration peripherer Monozyten in das ZNS über den Transfer von GFP⁺ Knochenmarkszellen in Empfängermäuse nachweisen. Die GFP⁺ Monozyten waren 24 h nach ECL im Parenchym des Hippocampus zu sehen und ähnelten nach morphologischen Kriterien 72 h nach Läsion den Mikroglia (Bechmann et al., 2005). Innerhalb der ersten 24 h nach ECL kann ein breites Spektrum an Chemokinen im ZNS nachgewiesen werden (Babcock et al., 2003). Das Chemokin C-C Chemokinligand 2 (CCL2), ein Ligand für den Rezeptor CCR2, ließ sich bereits nach 3 h und vor der ersten Infiltration von peripheren Leukozyten im ZNS detektieren und wird von Mikroglia und Astrozyten sezerniert (Babcock et al., 2003). Der Rezeptor CCR2 ist wichtig für die Rekrutierung peripherer Leukozyten in das ZNS, denn in einer CCR2 defizienten Maus blieb die Infiltration peripherer Leukozyten nach einer ECL (Babcock et al., 2003) und nach einer Rückenmarksläsion aus (Ma et al., 2002; Siebert et al., 2000).

Axonale Läsion führt zu einem Transport von Gehirnantigenen aus dem Gehirn in die drainierenden LK (Mutlu et al., 2006) und zu einer Expansion Myelin-spezifischer T-Zellen in den LK (Olsson et al., 1992). Nach Rückenmarksläsion bilden aktivierte B-Zellen Antikörper gegen Gehirnantigene (Ankeny et al., 2006). CD4⁺ T-Zellen können bis zu 90 Tage nach ECL in dem Läsionsgebiet beobachtet werden (Bechmann et al., 2001). In einer Studie wurde eine aktive Immuntoleranz gegenüber Gehirnantigenen nachgewiesen, indem Mäuse mit ECL behandelt und ab Tag 30 mit dem Gehirnantigen Proteolipid-Protein (PLP) immunisiert wurden, um eine passive EAE zu induzieren. Nach ECL waren die neurologischen Scores der EAE vermindert (Mutlu et al., 2006). In der selben Studie wurde das axonale Antigen Neurofilament-L (NF-L) in MHCII-positiven Zellen der zervikalen LK detektiert und eine erhöhte Apoptose der CD4⁺ T-Zellen beobachtet (Mutlu et al., 2006). Nach einem Transfer von Myelin-Basisches Protein (MBP)-spezifischen T-Zellen ließ sich nach einer ECL im Gebiet der axonalen Degeneration eine erhöhte Infiltration von T-Zellen reaktiv gegen

Myelin feststellen. Die infiltrierten T-Zellen verstärkten die Antwort der Mikroglia und die Beseitigung des Myelintrümmers durch Phagozytose (Nielsen et al., 2009). Myelintrümmers inhibieren das Auswachsen von Neuriten und die Remyelinisierung. Die Beseitigung von Myelintrümmern durch Mikroglia hat eine Auswirkung auf die regenerativen Prozesse nach axonaler Läsion (Kotter et al., 2006; Schwab, 1990).

1.3.2 Ischämischer Schlaganfall

Der Schlaganfall ist die zweithäufigste Todesursache weltweit (Murray and Lopez, 1997). Schlaganfälle können entweder ischämisch oder hämorrhagisch bedingt sein (Donnan et al., 2008). Die am häufigsten vorkommenden Ursachen für einen Schlaganfall sind (Kumar and Clark, 2009):

1. Arterielle Embolie aus Herz, Halsschlagader (*Arteria carotis communis oder interna*), *Arteria basilaris* oder *vertebralis*, welche zum Hirninfarkt führt.
2. Partieller oder kompletter Gefäßverschluss der hirnversorgenden Arterien (*Arteria vertebralis, basilaris, carotis communis oder interna*) oder Hirnarterien (z. Bsp. *Arteria cerebri media, anterior oder posterior*), z. Bsp. infolge lokaler Thrombosen bei Arteriosklerose, Vaskulitis oder Dissektionen.
3. Subarachnoide oder intrakranielle Hämorrhagie.

Der, durch eine Thromboembolie verursachte, ischämische Infarkt kommt mit 80 % am häufigsten vor, gefolgt von zerebraler und zerebellarer Hämorrhagie mit 10 % und subarachnoider Hämorrhagie mit 5 % (Kumar and Clark, 2009). Der ischämische Infarkt wird durch eine transiente oder permanente Reduktion des zerebralen Blutflusses verursacht (Dirnagl et al., 1999). Zur Erforschung des ischämischen Schlaganfalls wird im Modell eine fokale zerebrale Ischämie über einen permanenten oder transienten Verschluss von Gefäßen induziert (Mergenthaler and Meisel, 2012). Das Fadenmodell zum Verschluss der mittleren zerebralen Arterie (MCAO) ist das am häufigsten verwendete Modell zur Induktion eines ischämischen Infarkts. In dem Modell lässt sich transient oder permanent die mittlere zerebrale Arterie durch das Einführen eines Fadens verschließen (Carmichael, 2005; Engel et al., 2011). Bei einem transienten Verschluss wird nach einer definierten Zeitdauer (z. Bsp. 30, 45 oder 60 min bei der Maus) der Faden entnommen und die Reperfusion des Gefäßes eingeleitet. Mit dem Variieren der Zeitdauer des Verschlusses lässt sich die Läsionsgröße des Infarktes regulieren (Engel et al., 2011). Mit dem transienten Verschluss werden die Effekte einer spontanen Reperfusion oder die klinisch relevantere Situation einer erfolgreichen Lysis mit gewebspezifischen Plasminogenaktivator (rt-PA) nachgeahmt (Mergenthaler and Meisel, 2012).

Die verminderte Blutzufuhr führt lokal zu einer verminderten Versorgung von Sauerstoff und Glukose des neuronalen Gewebes und führt zu Störungen der Membranpotentiale

und zahlreicher Energie-abhängiger Prozesse (Dirnagl et al., 1999). In Folge werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle aktiviert und exzitatorische Aminosäuren, wie zum Beispiel Glutamat, freigesetzt. Glutamat akkumuliert im extrazellulären Raum und aktiviert NMDA-Rezeptoren und metabotrope Rezeptoren. Durch einen universellen Anstieg an Ca^{2+} im ischämischen Gebiet werden proteolytische Enzyme aktiviert, welche zur Schädigung des Gewebes erheblich beitragen. Zusätzlich entstehen freie Radikale welche Zellmembrane zerstören und Apoptosis und Inflammation auslösen (Dirnagl et al., 1999). Durch einen vermehrten Einstrom von Na^+ und Cl^- in die Zellen kommt es zu einem passiven Wassereinfluss in die Zellen und es kommt zur Ausbildung eines zytotoxischen Hirnödems. Besteht die Ischämie länger und bricht die BHS zusammen, strömen Plasmabestandteile und damit osmotisch aktive Substanzen in den Extrazellulärraum. Dies führt zu einer Zunahme des Wassergehalts und wird als vasogenes Hirnödem bezeichnet (Dirnagl et al., 1999; Mumenthaler, 2008). Das ischämische Hirnareal ist jedoch nicht homogen von den oben beschriebenen haemodynamischen, metabolischen und ionischen Veränderungen betroffen (Dirnagl et al., 1999). Bei einem Hirninfarkt sinkt in dem Kerngebiet der zerebrale Blutfluss so weit, dass es zu einem Zellsterben kommt (Dirnagl et al., 1999; Hossmann, 1994). Dieser irreversibel geschädigte Kern wird in der Regel von einer Penumbra umgeben, in welcher der Energiemetabolismus zum Teil erhalten ist und der Blutfluss einen bestimmten Schwellenwert nicht unterschreitet (Astrup et al., 1981). Mit der Zeit und ohne Behandlung kann es auch in der Penumbra zur Infarktbildung kommen (Dirnagl et al., 1999).

1.3.2.1 Immunantwort nach zerebraler Ischämie

Nach einem ischämischen Infarkt im Gehirn findet lokal und systemisch eine komplexe Reaktion des Immunsystems statt. An den immunologischen Prozessen sind sowohl Komponenten des angeborenen, als auch des adaptiven Immunsystems beteiligt (Nilupul Perera et al., 2006; Wang et al., 2007). Durch den Anstieg von freien Sauerstoffradikalen, der Hypoxie und der Aktivierung von second-messenger Signalwegen über Ca^{2+} werden eine Reihe an Transkriptionsfaktoren aktiviert, welche zur Expression von proinflammatorischen Genen führen, wie u.a. NF- κ B, Hypoxie-induzierbarer-Faktor-1 und *signal transducer and activator of transcription-3* (STAT3; Dirnagl et al., 1999; Wang et al., 2007). Bereits Stunden nach einer MCAO kommt es zu einer erheblichen Aktivierung und Akkumulation von Mikroglia in der ischämischen Hemisphäre (Campanella et al., 2002; Gelderblom et al., 2009; Wang et al., 2007). Stunden bis Tage nach einer ischämischen Läsion infiltrieren Leukozyten, wie zum Beispiel Makrophagen, dendritische Zellen und Lymphozyten aus dem Blut in das Gehirnparenchym (Campanella et al., 2002; Davies et al., 1998; Garcia et al., 1994;

Gelderblom et al., 2009; Jander et al., 1995). Adhäsionsmoleküle werden auf Endothelzellen der Gefäße im Gehirn exprimiert und bewirken das Anheften und Infiltrieren peripherer Leukozyten (Stoll et al., 1998; Wang et al., 2007). Aktivierte MMPs, Cyclooxygenase-2 (COX-2) und Gefäßendothel-Wachstumsfaktor (VEGF) bewirken innerhalb Stunden bis Tage nach Ischämie eine Disruption der BHS, welche die Passage von Plasmabestandteilen und peripheren Leukozyten in das Gehirn bewirkt. Die Inhibition von MMPs, VEGF und COX-2 kann sich Initial günstig auf den Krankheitsverlauf auswirken (Candelario-Jalil et al., 2007; Heo et al., 1999; Zhang et al., 2000). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass MMPs und VEGF zu späteren Zeitpunkten an Regenerations- und Revaskularisierungsprozessen im Gehirn beteiligt sind (Hermann and Zechariah, 2009).

Nach einem ischämischen Infarkt ist die Konzentration und Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IFN- γ , IL-6 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) im Gehirn erhöht (Liesz et al., 2009a; Luheshi et al., 2011; Offner et al., 2005). Ebenfalls sind erhöhte Werte antiinflammatorischer Zytokine, wie IL-10 und TGF- β 1, im Gehirn oder in der Zerebrospinalflüssigkeit nachweisbar (Offner et al., 2005; Tarkowski et al., 1997; Zhai et al., 1997). Chemokine spielen nach einem Schlaganfall ebenfalls eine wichtige Rolle, da diese bei der Migration von peripheren Leukozyten in das neuronale Parenchym eine wichtige Funktion haben. Chemokine haben chemotaktische Eigenschaften und können zur Öffnung der BHS nach einer Ischämie beitragen. Zahlreiche Chemokine, wie u.a. CCL5, Monozyten-chemoattraktives Protein-1 (MCP-1), Makrophagen-inflammatorisches Protein-1 α (MIP-1 α) und Fraktalkin, werden nach einem ischämischen Infarkt im betroffenen Hirngewebe hoch reguliert (Offner et al., 2005; Pang et al., 2001; Tarozzo et al., 2002).

1.3.2.1.1 Effekte der Immunantwort nach Ischämie

Die akute Immunantwort nach einer Ischämie wird zum größten Teil als schädlich für das neuronale Gewebe angesehen und trägt erheblich zu einer sekundären Ausbreitung des Infarktgebiets bei. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass nach einer Depletion neutrophiler Granulozyten die Infarktvolumina erheblich vermindert waren (Connolly et al., 1996). In immundefizienten Mausstämmen, bei denen T- und B-Zellen fehlten, war die Infarktgröße stark reduziert (Hurn et al., 2007; Kleinschnitz et al., 2010). In der Rekombination-Aktivierungsgen-1 (RAG1)^{-/-} Maus, einer Maus ohne adulte T- und B-Zellen, ist die verminderte Infarktgröße mit einem T-Zelltransfer, jedoch nicht mit einem B-Zelltransfer, umkehrbar (Kleinschnitz et al., 2010; Shichita et al., 2009; Yilmaz et al., 2006). In Mäusen mit einer Gendefizienz für Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, CD11b/CD18 oder P-Selektin ist die Infiltration von peripheren Leukozyten reduziert und es entwickeln sich kleinere Infarkte (Connolly et

al., 1996; Soriano et al., 1999). Ähnliche Effekte lassen sich bei einer Blockade von Adhäsionsmolekülen durch Antikörper beobachten (Becker et al., 2001; Relton et al., 2001; Yenari et al., 1998).

Der erste Effekt von T-Zellen nach einer Ischämie wird als eine unspezifische Immunreaktion angesehen (Kleinschnitz et al., 2010). T-Zellen können nach einer MCAO im Gehirn die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ (Liesz et al., 2009a; Yilmaz et al., 2006) und IL-17 (Shichita et al., 2009) sekretieren, und somit möglicherweise zu einer sekundären Schädigung beitragen. Die frühe schädigende Antwort durch T-Zellen hängt nicht mit adaptiven Immunmechanismen, wie die Erkennung von Antigenen und Kostimulation, zusammen (Kleinschnitz et al., 2010). T-Zellen haben nach einem experimentellen Schlaganfall nicht nur schädigende Effekte. Tregs können über die Expression des IL-10, welches die Produktion von TNF- α und IFN- γ antagonisiert, zu einer Protektion des neuronalen Gewebes beitragen (Liesz et al., 2009a). Das Zytokin IL-4, welches von Th2-Zellen exprimiert wird, scheint ebenfalls eine neuroprotektive Funktion nach transientser fokaler Ischämie zu haben (Xiong et al., 2011).

Die Auswirkung der immunreaktiven Mikroglia nach einem ischämischen Infarkt ist bislang noch weitgehend umstritten und wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Nedergaard and Dirnagl, 2005; Wang et al., 2007). Die Aktivierung der Mikroglia führt zu einer Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel IL-1 und TNF- α (Lambertsen et al., 2005; Luheshi et al., 2011), welche zu einer Neurodegeneration im Gehirn nach Schlaganfall beitragen (Rothwell and Luheshi, 2000). Mikroglia können nach einer Ischämie Toll-Like-Rezeptoren (TLR) hoch regulieren, was zu einer weiteren Aktivierung durch endogene Aktivatoren, wie Gefahr-assoziiertes molekulares Muster (DAMP), führen kann und zu einer Vergrößerung des Infarktgebiets führt (Bohacek et al., 2012; Lehnardt et al., 2007). Andererseits führte am Tag 7, folglich zu einem späten Zeitpunkt, nach MCAO der *knockout* des TLR2 zu einer reduzierten Aktivierung von Mikroglia und in Folge zu einem vergrößerten Infarkt (Bohacek et al., 2012). Ebenfalls konnte nach einer MCAO die Sekretion von TGF- β durch Mikroglia nachgewiesen werden, welches vermutlich an späten Zeitpunkten zur Neuroprotektion beiträgt (Pál et al., 2012).

1.3.2.1.2 Systemische Immunantwort

Neben dem lokalen Immungeschehen im Gehirn findet eine systemische Immundepression statt, welche zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Infektionen führt (Prass et al., 2003). Möglicherweise stellt die systemische Immundepression eine adaptive Antwort dar, die das Gehirn vor schädigenden Immuneinflüssen schützen kann (Meisel et al., 2005; Neumann-Haefelin et al., 2000).

Andererseits kann eine, durch Bakterien ausgelöste, systemische Inflammation nach einer MCAO die Immunantwort gegenüber Gehirnantigenen modulieren und zu einer verschlechterten funktionellen Erholung führen (Becker et al., 2005; Gee et al., 2007). Durch die Disruption der BHS nach einem ischämischen Infarkt werden Antigene aus dem Gehirn vermehrt in das Blut freigesetzt und können so vom Immunsystem in der Peripherie erkannt werden (Gee et al., 2007). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die mukosale Administration des Gehirnantigens MBP vor der MCAO eine TGF- β vermittelte T-Zellantwort induziert und so bis zu ein Monat nach Ischämie zu einer verbesserten funktionellen Erholung führt (Gee et al., 2008). In einer Folgestudie konnte wiederum gezeigt werden, dass der zerebroprotektive Effekt drei Monate nach Ischämie sich von einer TGF- β vermittelten T-Zellantwort zu einer gegen MBP gerichteten Th1-Antwort entwickeln kann (Gee et al., 2009).

Nach MCAO findet in der Peripherie eine ausgeprägte Veränderung des Immunsystems statt. Schon 22 h nach einer experimentellen Ischämie kann eine erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und C-C-Chemokinrezeptoren (CCR) in der Milz nachgewiesen werden (Offner et al., 2005). Die Milz atrophiert und eine erhöhte Apoptose ist in der Milz nachweisbar und die Anzahl der B-Zellen nimmt in der Milz ab (Offner et al., 2006; Prass et al., 2003). Zusätzlich lassen sich vermehrt Makrophagen im Blut und Tregs in der Milz nachweisen (Offner et al., 2006). In Patienten mit ischämischen Schlaganfall wurden bis Tag 7 nach Infarkt erhöhte IL-6 Werte im Blut registriert (Emsley et al., 2003).

1.4 Hypothese und Zielsetzung der Doktorarbeit

Die Beteiligung Foxp3⁺ Tregs nach einer Verletzung des Gehirns an der Aufrechterhaltung einer Immuntoleranz gegenüber Gehirnantigenen ist bislang noch unzureichend erforscht. Die Verteilung und Funktion autoreaktiver Foxp3⁺ Tregs im Gehirn zu späten Zeitpunkten nach einer Verletzung ist noch weitgehend ungeklärt. In diesem Zusammenhang ist es interessant, ob eine axonale oder ischämische Läsion im Gehirn eine antigenspezifische Neubildung und Expansion von Foxp3⁺ Tregs bewirkt. Aus diesem Grund wurden für die Analysen die Tage 7, 14 und 30 nach einer Verletzung des Gehirns ausgewählt. Am Tag 30 nach ECL wurde nach der Induktion einer EAE ein abgeschwächter Krankheitsverlauf durch die Bildung einer Immuntoleranz beobachtet (Mutlu et al., 2006). Der kausale Zusammenhang zu Foxp3⁺ Tregs wurde jedoch nie demonstriert.

Folgende Hypothese wurde in der vorliegenden Doktorarbeit aufgestellt: Foxp3⁺ Tregs haben nach einer Läsion im Gehirn eine wichtige Funktion bei der Toleranzentwicklung

Einleitung

gegenüber Gehirnantigenen und es findet eine antigenspezifische Induktion von T-Zellen statt, die zu einer Neubildung und Vermehrung von Foxp3⁺ Tregs führt.

Zur Überprüfung der Hypothese wurden folgende Fragestellungen experimentell bearbeitet:

1. Akkumulieren CD4⁺ T-Zellen, Foxp3⁺ Tregs und antigenpräsentierende Zellen an den Tagen 7, 14 und 30 nach ECL in dem lädierten Hirnareal?
2. Akkumulieren CD4⁺ T-Zellen und Foxp3⁺ Tregs in der ischämischen Hemisphäre an den Tagen 7, 14 und 30 nach einer MCAO? Wie ist die Verteilung der CD4⁺ T-Zellen und Foxp3⁺ Tregs in den peripheren lymphatischen Organen?
3. Werden CD4⁺ T-Zellen nach MCAO aktiviert?
4. Findet nach MCAO eine Proliferation CD4⁺ T-Zellen und Tregs im Gehirn und in der Peripherie statt?
5. Unterscheidet sich die Spezifität der CD4⁺ T-Zellen und Foxp3⁺ Tregs in der ischämischen Hemisphäre von den peripheren lymphatischen Organen?
6. Ist die Anzahl CD4⁺ Zellen und Foxp3⁺ Tregs nach MCAO in lymphatischen Organen verändert?
7. Findet nach MCAO im Gehirn und in der Peripherie eine *de novo* Induktion Foxp3⁺ Tregs statt?
8. Welche antigenpräsentierenden Zellen akkumulieren in der ischämischen Hemisphäre 7, 14 und 30 Tage nach einer MCAO? Werden lokale Mikroglia zu diesen späten Zeitpunkten aktiviert?
9. Werden nach MCAO im ischämischen Gehirn Zytokine, Chemokinrezeptoren und andere Moleküle der adaptiven Immunantwort exprimiert, die auf eine lokale Immunantwort, aktive Rekrutierung und Reaktivierung von T-Zellen hindeuten?
10. Hat die Depletion CD25⁺ Tregs nach MCAO eine Wirkung auf Immunkomponenten im Gehirn und auf die späte Entwicklung der Läsionsvolumina und der Erholung im Gangverhalten?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Materialien für die Anwendung im Labor

In Tabelle 1 sind alle gekauften Substanzen und Chemikalien für die Anwendung im Labor aufgelistet. Tabelle 2 enthält alle im Labor hergestellten Lösungen. In Tabelle 3 sind sonstige Laborutensilien aufgelistet. In Tabelle 4 sind alle Kits, welche für die molekular- und zellbiologischen Methoden verwendet wurden, aufgelistet.

Tabelle 1: Von Firmen erworbene Substanzen und Chemikalien nach Handelsname alphabetisch sortiert.

Handelsname	Hersteller, Firmensitz	Artikelnr.
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe, DE	P726
Collagenase VIII	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	C2139
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	M6250
Natriumdihydrogen-phosphat	Roth, Karlsruhe, DE	5075
Dako Pen	Dako, Glostrup, Denmark	S2002
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe, DE	T877
Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe, DE	X987
Easycoll (Dichte 1,124 g/ml)	Biochrom AG, Berlin, DE	L6143
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe, DE	8040
Einbettmedium (Tissue Freezing Medium)	Leica, Nussloch, DE	02010892 6
Ethanol 96% , vergällt (MEK)	Herbeta Arzneimittel, Berlin, DE	-
Ethanol absolut, reinst	Roth, Karlsruhe, DE	5054
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, DE	S 0115
Histopaque-1083	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	1083-1
Immu-Mount	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	9990402
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, DE	6781
Methanol (Rotipuran)	Roth, Karlsruhe, DE	4627
2-Methylbutan	Roth, Karlsruhe, DE	3927
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, DE	3957
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe, DE	9356
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, DE	P018
Normales Ziegenserum	Vector Labs, Burlingame, CA, USA	S-1000
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, DE	0335
PBS-Lösung mit Ca^{2+} und Mg^{2+}	Biochrom AG, Berlin, DE	L 1825
RPMI 1640	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	21875-034
Trypan-Blau (0,4 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	T-8154
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	X-100
Trisbase (Pufferan)	Roth, Karlsruhe, DE	AE15

Material und Methoden

Tabelle 2: Im Labor hergestellte Lösungen alphabetisch sortiert nach Bezeichnung.

Bezeichnung	Zusammensetzung
35 %ige Gradientenlösung	35 % (Dichte 1,047 g/ml) Easycoll in RPMI 1640
70 %ige Gradientenlösung	70 % (Dichte 1,083 g/ml) Easycoll in RPMI 1640
70 %iges Ethanol (vergällt)	Aqua dest. mit 70 % vergälltes Ethanol
70 %iges Ethanol (unvergällt)	Aqua dest. (Typ II) mit 70% reinst Ethanol, für molekularbiologische Anwendungen
Aqua dest.	Deionisiertes und gefiltertes Leitungswasser durch Millipore Typ I mit Elix-5 5 Purifications System (Herstellerfirma Millipore aus Billerica, MA, USA)
Aqua dest. (Typ II)	Aqua dest. weiter deionisiert und gefiltert mit Milli-Q Synthesis A 10 System für molekularbiologische Anwendungen (RNase frei)
Blocklösung 5 %	5 % Normal Goat Serum in PTX 0,2 %.
Collagenase-Lsg.	1 mg/ml Collagenase VIII gelöst in PBS-Lösung mit Ca^{2+} und Mg^{2+}
FACS-Puffer	2 % FKS in PBS
Fixierungs/ Permeabilisierungs-Lsg.	Aus dem „Foxp3 Staining Set“ von eBioscience: 1 Teil Konzentrat gemischt mit 3 Teilen Verdünner
Lysis (RLT)-Puffer	0,14 M β -Mercaptoethanol in RLT-Puffer aus dem „RNeasy Midi Kit“
MACS-Puffer	0,5% FKS in PBS mit 2 mM EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat
NaCl-Lsg. 0,9 %	0,9 % Natriumchlorid gelöst in aqua dest.
NaOH-Lsg. 0,1 M	4 g/l Natriumhydroxid in aqua dest. zur Herstellung 0,1 M Lsg.
PB 0,1 M	Aqua dest. mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat und 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat
PBS (1x, pH 7,4)	140 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat und 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat gelöst in aqua dest.
Permeabilisierungs-Puffer	Aus dem „Foxp3 Staining Set“ von eBioscience: 10x Permeabilisierungs-Puffer mit aqua dest. auf 1x runter verdünnt
PFA 4 %	4% Paraformaldehyd in aqua dest. mit 0,1M NaOH-Lsg. bei 60°C gelöst und auf pH 7,4 eingestellt
PTX 0,2 %	0,2% Triton X-100 in PBS gelöst
Sucrose-Lsg. (10 %, 20 %, 30 %)	PB 0,1 M mit 10 %, 20 % oder 30 % D(+)-Saccharose
Zelllysepuffer	Kurz vor Verwendung: 1 Teil Ammoniumchlorid-Lsg. (0,16M in aqua dest.) mit 9 Teilen Trisbase-Lösung (0,17M in PBS) gemischt

Tabelle 3: Sonstige Laborutensilien nach Bezeichnung alphabetisch sortiert.

Handelsname	Hersteller, Firmensitz	Beschreibung
EasySep Magnet (lila)	Stemcell-Technologies, Vancouver, Kanada	Für B Zellsortierung
FACS-Rundbodenröhrchen	BD Biosciences, San José, CA, USA	5 ml, Polystyrol
LS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE	Säulen für Zellsortierung
MidiMACS Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE	Magnet für CD4 ⁺ T-Zellsortierung
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, DE	Verschließbar, RNase frei, 500 µl, 1 ml und 2 ml
Zentrifugenröhrchen	BD Falcon, San José, CA, USA	15 ml und 50 ml, Polypropylen
Zellsiebe	BD Biosciences, San José, CA, USA	70 µm

Tabelle 4: Für molekular- und zellbiologische Methoden verwendete *Kits*. Nach Bezeichnung alphabetisch sortiert.

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz	Artikelnr.	Verwendung
B Cell Enrichment Kit	Stemcell-Technologies, Vancouver, Kanada	19754	B-Zellsortierung
CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE	130-090-860	CD4 ⁺ T-Zellsortierung
Foxp3 Staining Set	eBioscience, San Diego, CA, USA	72-5775	Intrazelluläre Foxp3 und Ki-67 Färbung.
Quantitect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Valencia, CA, USA	205311	cDNA Herstellung
RNeasy Midi Kit	Qiagen, Valencia, CA, USA	75144	RNA-Isolation
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x)	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA	4366072	TaqMan Real-Time PCR

2.1.2 Labor- und Messgeräte

Tabelle 5: Labor- und Messgeräte nach Bezeichnung alphabetisch sortiert.

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz	Typ, Verwendung
ABI PRISM 7500	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA	Real-Time PCR Detektionssystem
BD LSRII	BD Biosciences, San José, CA, USA	Durchflußzytometer
Catwalk 7.1	Noldus, Wageningen, Niederlande	Ganganalyse
Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, DE	Tischzentrifuge
FACSARIA	BD Biosciences, San José, CA, USA	Durchflußzytometer, Sortierung

Tabelle 5 (Fortsetzung)

FACSCanto II	BD Biosciences, San José, CA, USA	Durchflußzytometer
Frigocut 2800e	Leica, Wetzlar, DE	Kryostat, Mikrotom
Leica TCS-SL	Leica, Wetzlar, DE	Konfokalmikroskop
Megafuge 1.0R	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	Zentrifuge mit Schwenkrotor
MS2 Minishaker	IKA, Staufen, DE	Vortexer
NanoPhotometer	Implen, München, DE	Spektrophotometer, RNA-Messung
Olympus BX 51	Olympus, Hamburg, DE	Fluoreszenz-, Durchlichtmikroskop
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, DE	cDNA Herstellung
Zeiss LSM5 Exciter	Carl Zeiss, Jena, DE	Konfokalmikroskop

2.1.3 Geräte, Substanzen und chirurgisches Werkzeug für *in vivo* Versuche

In Tabelle 6 sind alle Geräte, Substanzen und chirurgisches Werkzeug, welche für die ECL, MCAO, Messungen am Magnetresonanztomographen (MRT) und Organentnahme verwendet wurden, aufgelistet.

Tabelle 6: Geräte, Substanzen und chirurgisches Werkzeug für ECL, MCAO, MRT-Messung und Organentnahme sind nach Bezeichnung alphabetisch sortiert.

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz	Typ, Kurzbeschreibung	Verwendung
Autoclip	Stoelting, Wood Dale, IL, US	Material zum Wundverschluss	ECL
Autoclip Applier	Stoelting, Wood Dale, IL, US	Material zum Wundverschluss	ECL
Chirurgische Knochenfräse	Meisinger, Neuss, DE	HM 141F 010	ECL
Chirurgische Pinzette	B Braun, Melsungen, DE	1X2 Zähne, BD665R	MCAO, ECL, Organentnahme
Desinfektionsmittel	B Braun, Melsungen, D	Softasept N	MCAO, ECL
Faden	Johnson & Johnson, Norderstedt, DE	Mersilene geflochten, Nahtmaterial	MCAO
Fellschere	B Braun, Melsungen, DE	Gerade, spitz BC060R	MCAO, ECL, Organentnahme
Gefäßschere	F.S.T, Heidelberg, DE	spring scissor	MCAO
Isofluran	Abbott, Abbott Park, IL, USA	Inhalations-narkotikum	MCAO, MRT
Isofluran-verdampfer	Völker, Kaltenkirchen, DE	Isofluranzufuhr über Atmung	MCAO, MRT
Ketamin (500 mg/10 ml)	Actavis, München, DE	Injektionsnarkotikum Wirkstoff: Ketamin-Hydrochlorid	<i>s. Ketamin/Rompun-Gemisch</i>

Tabelle 6 (Fortsetzung)

Ketamin/Rompun-Gemisch	Gemisch aus Injektions-narkotika	10 mg/ml Ketamin und 8% „Rompun solution 2%“ in „NaCl 0,9% injekt.“ transferiert	MCAO, ECL, Organentnahme
Spatel	Roth, Karlsruhe, DE	150 mm, löffelförmig,	Organentnahme
NaCl 0,9% injekt.	B Braun, Melsungen, DE	Sterile Injektionslösung in 50 ml Flasche	MCAO, ECL
Mikroknüpf-pinzette	B Braun, Melsungen, DE	Gebogen, FD281R	MCAO, ECL, Organentnahme
Mikropinzette	B Braun, Melsungen, DE	Uhrmacher Typ, BD331R	MCAO, ECL, Organentnahme
Monitoring-System	SA Instruments, Stony Brook, NY, USA	Messung der Atemfrequenz	MCAO
Heating Controller	Hugo Sachs, March-Hugstetten, DE	Mit heizbarem OP-Tisch; Typ 861-862)	MCAO
Wärmekasten	Peco Services, Cumbria, UK	MediHeat 1200, mit Thermostat	MCAO
Nylonfilament	Deknatel, Athlone, Irland	6-0, monofilament, polyamid	MCAO
Pharmascan 70/16	Bruker BioSpin, Ettlingen, DE	7 Tesla MRT-Scanner	MRT
Pinzette	F.S.T, Heidelberg, DE	Graefe Forceps, straight	MCAO
Rompun Solution 2%	Bayer, Leverkusen, DE	Injektionslösung	<i>s. Ketamin/Rompun-Gemisch</i>
Silikon	Heraeus Kulzer, Wehrheim, DE	Provil Novo Light (Base, Catalyst)	MCAO
Splitterpinzette	B Braun, Melsungen, DE	Gebogen, BD312	MCAO, ECL, Organentnahme
Stereomikroskop	Leica, Nussloch, DE	Leica MZ125	MCAO
Stereotaktischer Kopfhalter	Stoelting, Wood Dale, IL, US	2 mm breite Klinge an Halterung befestigt	ECL
Terylene-Faden	Serag Wiessner, Naila, DE	5-0, nicht resorbierbar	MCAO
Xylocaingel 2%	AstraZeneca, London, UK	Wirkstoff: Lidocainhydrochlorid, Lokalanästhesie	MCAO

2.1.4 Antikörper für Durchflusszytometrie

Alle Antikörper sind monoklonal und reaktiv mit dem jeweiligen Antigen aus Maus. Die Antikörper sind mit einem Fluorochrom oder mit Biotin direkt konjugiert und wurden von BD Biosciences (San José, CA, USA), eBioscience (San Diego, CA, USA), Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, DE) oder Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) erworben (Tabelle 7).

Tabelle 7: In der Durchflusszytometrie verwendete Antikörper nach Bezeichnung alphabetisch und numerisch sortiert.

Bezeichnung (Antigen- Fluorochrom)	Aus Spezies, Klon	Hersteller	Konzentration für Färbung
CD11b-APC	Ratte, M1/70	BD Biosciences	5 µl/ml
CD11b-APC-Cy7	Ratte, M1/70	BD Biosciences	5 µl/ml
CD11c-FITC	Hamster, HL3	BD Biosciences	10 µl/ml
CD25-APC	Ratte, PC61	Invitrogen	5 µl/ml
CD25-APC	Ratte, 7D4	Miltenyi Biotec	50 µl/ml
CD4-Alexa 700	Ratte, RM4-5	BD Biosciences	5 µl/ml
CD4-V500	Ratte, RM4-5	BD Biosciences	5 µl/ml
CD45-PE-Cy7	Ratte, 30-F11	BD Biosciences	10 µl/ml
CD45R/B220-PE	Ratte, RA3-6B2	BD Biosciences	10 µl/ml
CD45RB-PE	Ratte, 16A	BD Biosciences	10 µl/ml
CD8a-Pacific Blue	Ratte, 53-6.7	BD Biosciences	5 µl/ml
Foxp3-PE	Ratte, FJK-16a	eBioscience	10 µl/ml
Ki-67-FITC	Maus, B56	BD Biosciences	125 µl/ml
MHCII (I-A/I-E)-PE	Ratte, M5/114.15.2	BD Biosciences	10 µl/ml
TCRβ-Biotin	Hamster, H57- 597	BD Biosciences	10 µl/ml
Vβ8.1/8.2 TCR-Biotin	Maus, MR5-2	BD Biosciences	5 µl/ml
Vβ11 TCR-PE	Ratte, RR3-15	BD Biosciences	5 µl/ml
Gegen Biotin:			
Streptavidin-PerCP	-	BD Biosciences	5 µl/ml
Block Fc-Rezeptor:			
CD16/CD32, purifiziert	Ratte, 2.4G2	BD Biosciences	10 µl/ml

2.1.5 Antikörper für Immunhistochemie

Primärantikörper, Sekundärantikörper und Marker sind in Tabelle 8 und Tabelle 9 aufgelistet. Die Antikörper und Marker wurden von Abcam (Cambridge, UK), BD Biosciences (San José, CA, USA), Dako (Glostrup, Denmark), eBioscience (San Diego, CA, USA), Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) oder Wako (Wako Chemicals, Osaka, Japan) erworben.

2.1.5.1 Primärantikörper

Tabelle 8: In der Immunhistochemie verwendete Primärantikörper nach Bezeichnung alphabetisch und numerisch sortiert.

Bezeichnung (Antigen)	Aus Spezies, Klon	Hersteller, Artikelnummer	Konzentration für Färbung
CD11c Biotin	Hamster, N418	eBioscience, 13-0114-81	1,3 µl/ml
CD4	Ratte, RM4-5	BD Biosciences, 553043	4 µl/ml
GFP	Huhn, polyklonal	Abcam, ab13970	1 µl/ml
GFP	Kaninchen, polyklonal	Abcam, ab6556	0,4 µl/ml
Iba1	Kaninchen, polyklonal	Wako, 019-19741	0,5 µl/ml
Laminin	Kaninchen, polyklonal	Sigma-Aldrich, GW20044F	3,3 µl/ml
MHC II (I-A/I-E)	Ratte, M5/144.15.2	eBioscience, 14-5321-81	3,3 µl/ml

2.1.5.2 Sekundärantikörper, Streptavidin und DAPI

Tabelle 9: In der Immunhistochemie verwendete Sekundärantikörper und Marker nach Bezeichnung alphabetisch und numerisch sortiert.

Bezeichnung (evtl. Antigen, Fluorochrom)	Aus Spezies	Hersteller, Artikelnummer	Konzentration für Färbung
DAPI	-	Roche, 10236276001	0,5 µg/ml
Huhn IgY, Alexa Fluor 633	Ziege	Invitrogen, 21103	2 µl/ml
Huhn IgY, FITC	Ziege	Abcam, ab7114	2 µl/ml
Kaninchen IgG, Alexa Fluor 488	Ziege	Invitrogen, 11008	2 µl/ml
Kaninchen IgG, Alexa Fluor 568	Ziege	Invitrogen, 11036	4 µl/ml
Ratte IgG, Alexa Fluor 568	Ziege	Invitrogen, 11077	1 µl/ml
Ratte IgG, Alexa Fluor 633	Ziege	Invitrogen, 21094	2 µl/ml
Streptavidin - Alexa Fluor 568	-	Sigma Aldrich, S-11226	0,1 µl/ml

2.1.6 Programme

Tabelle 10: Alle Programme sind nach Bezeichnung alphabetisch sortiert.

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz	Verwendung
ABI Prism Sequence Detection Software Version 1.6	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA	Real-Time PCR Detektion und Analyse
Analyze Version 5	AnalyzeDirect, Lenexa, USA	Analysesoftware zur Infarkt volumetrie
Bruker Paravision Software Version 4	Bruker BioSpin, Ettlingen, DE	Messung am MRT
Catwalk Version 7.1	Noldus, Wageningen, Niederlande	Ganganalyse
FACSDiva Version 6	BD Biosciences, San José, CA, USA	Software zu den BD Durchflusszytometern
FlowJo Version 9	Tree Star, Ashland, OR, USA	Analyse der Daten aus der Durchflusszytometrie
GraphPad-Prism Version 5	GraphPad-Prism, La Jolla, CA, USA	Statistische Auswertung
SPSS Version 15.0.1	SPSS inc., Chicago, IL, USA	Statistische Auswertung

2.2 Methoden

2.2.1 Mäusstämme und Tierhaltung

Foxp3EGFP Reportermäuse mit C57BL/6J Hintergrund wurden von B. Malissen zur Verfügung gestellt (Wang et al., 2008). RAG1^{-/-} Mäuse mit Hintergrundstamm C57BL/6J und C57BL/6J Wildtyp-Mäuse wurden von *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, USA) erworben. TCR transgene C57BL/6-Tg(Tcra2D2, Tcrb2D2)1Kuch/J Mäuse, mit der Laborbezeichnung 2D2-Mäuse, wurden von *The Jackson Laboratory* erworben. Foxp3EGFP und 2D2-Mäuse wurden homozygot gekreuzt, um doppelt-transgene 2D2.Foxp3EGFP Mäuse zu erhalten. Alle Mäusstämme wurden unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen in den Tierställen der Charité – Universitätsmedizin Berlin gehalten. Alle Eingriffe an den Mäusen wurden nach dem in Deutschland geltenden Tierschutzgesetz (TierSchG) durchgeführt. Alle Tierversuche wurde von dem Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) in Berlin genehmigt.

2.2.2 Operative Technik der entorhinalen Kortextläsion

Für die entorhinale Kortextläsion (ECL) wurden 8–14 Wochen alte Foxp3EGFP Reportermäuse verwendet. Mit einer i.p. Injektion des Ketamin/Rompun-Gemisches (10 µl/g Körpergewicht) wurden die Mäuse anästhesiert und anschließend in dem stereotaktischen Kopfhalter fixiert. Zunächst erfolgte ein feiner Fellschnitt über der Sagittalnaht der Schädeldecke. Ein Messer mit einer 2 mm breiten, nach unten gerichteten Klinge, welches an der Halterung des Stereotakten befestigt war, wurde mit

der unteren Kante längs an der Lambdanaht und mit der äußeren rechten Kante an der linken Seite der Sagittalnaht ausgerichtet. Von diesem Punkt aus wurden die Läsionskoordinaten eingestellt, indem das Messer 0,4 mm rostral und 1,8 mm lateral nach links bewegt wurde. Anschließend wurde mit einer chirurgischen Knochenfräse der Schädelknochen entlang der Läsionskoordinaten aufgebohrt. Danach wurde das Messer vertikal durch die entorhinale Kortex hindurch bis zum Grund des Schädels geführt, das Messer entnommen und die Fellöffnung mit einem *Autoclip* verschlossen. Für die Kontrollgruppe wurden alle Schritte, bis auf die Öffnung des Schädelknochens und dem Setzen der Läsion, durchgeführt.

2.2.3 Operative Technik zum Verschluss der mittleren Gehirnarterie

Das Fadenmodell zur Induktion einer fokalen Ischämie in der Maus wurde aus dem Labor von Dr. Ulrike M. Steckelings im *Center for Cardiovascular Research* (CCR) in Berlin übernommen. Arbeiten mit dieser speziellen Methodik sind bereits mit einem äquivalenten Rattenmodell in Schmerbach et al. (2008) veröffentlicht. Für die MCAO wurden Mäuse im Alter von 8–14 Wochen verwendet. Zur Einleitung der Anästhesie wurde den Mäusen 4 % (v/v) Isofluran/Sauerstoffgemisch und während der Operation 1,5 % bis 2 % (v/v) Isofluran/Sauerstoffgemisch mit einem Inhalationsverdampfer zugeführt. Die Operation fand auf einem beheizbaren OP-Tisch statt. Mit dem *Heating Controller* wurde die Körpertemperatur der Maus während der Operation zwischen 36 °C und 37 °C gehalten. Nach der Rasur und Desinfektion des Halsbereiches wurde ein feiner Fellschnitt über dem Speicheldrüsengewebe im linken Halsbereich durchgeführt (Abb. 4A). Das Bindegewebe wurde vorsichtig mit Mikroknüpfpinzetten zur Seite gezogen, um die linke *Arteria carotis communis* freizulegen. Anschließend wurde eine Ligatur mit einem 5-0 Terylene-Faden um die *Arteria carotis communis* gesetzt. Eine weitere Ligatur wurde hinter der Bifurkation um die *Arteria carotis externa* gesetzt. Zunächst wurde zum Unterbinden des Blutstroms aus der *Arteria carotis interna* unter die *Arteria carotis communis* eine leicht geöffnete Pinzette gelegt. Die *Arteria carotis communis* wurde mit einer Gefäßschere geöffnet und ein mit Silikon beschichtetes und an der Spitze verdicktes 6-0 Nylonfilament eingeführt. Mithilfe der Mikroknüpfpinzette wurde dieses Nylonfilament in die *Arteria carotis interna* und weiter bis zur *Arteria cerebri media* geschoben (Abb. 4B). Mit einem einfachen Knoten wurde das beschichtete Nylonfilament kurz vor der Bifurkation fixiert, um einen transienten Verschluss der linken *Arteria cerebri media* zu gewährleisten. Die Fellöffnung wurde anschließend mit einem einfachen Knoten zusammengenäht und die Maus in einen Wärmekasten mit 30 °C Lufttemperatur gelegt, um die Körpertemperatur nicht unter 36 °C sinken zu lassen. Nach 30 min wurde das beschichtete Nylonfilament aus dem Gefäß entfernt, die Fellöffnung mit einem Faden zugenäht und die Wundstelle mit

Xylocaingel 2 % anästhesiert. In der Sham-Kontrollgruppe wurde das beschichtete Nylonfilament bis zur *Arteria cerebri media* geschoben, jedoch sofort wieder entfernt, damit keine fokale Ischämie entsteht.

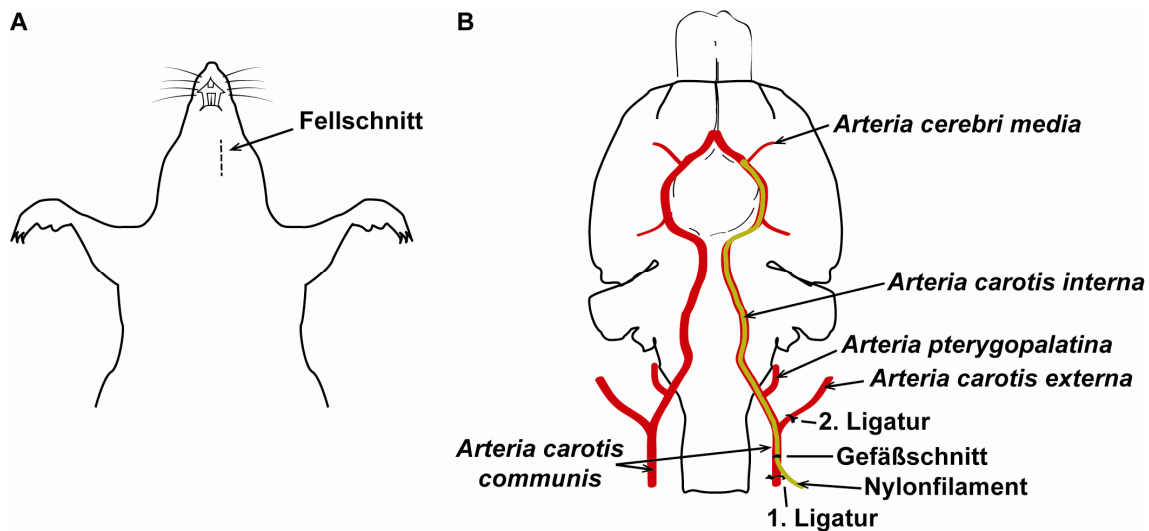


Abb. 4: Verschluss der mittleren Gehirnarterie. (A) Schematische Zeichnung der, auf dem OP-Tisch liegenden, Maus mit Ventralansicht. Zum Freilegen der *Arteria carotis communis* wurde ein Fellschnitt (gestrichelte Linie) im Halsbereich vorgenommen. (B) Schematische Zeichnung der Vaskulatur und des Gehirns mit Ventralansicht. Nachdem in der *Arteria carotis communis* ein kleiner Gefäßschnitt vorgenommen wurde, wurde das Nylonfilament eingeführt und bis zur *Arteria cerebri media* geschoben, um einen transienten Verschluss des Gefäßes zu gewährleisten.

2.2.4 Magnetresonanztomographie zur Analyse des Läsionsvolumens

Am Tag 4–6 nach MCAO wurden die Gehirne der Mäuse am Magnetresonanztomographen (MRT) bildlich dargestellt. Die Messungen wurden an einem 7-Tesla Scanner für Nagetiere (Pharmascan 70/16) mit der Bruker Paravision Software Version 4 durchgeführt. Die Narkose wurde mit 4 % (v/v) Isofluran/Sauerstoffgemisch eingeleitet und mit 1,5–2 % (v/v) Isofluran/Sauerstoffgemisch während der Messung aufrecht gehalten. Die Atemfrequenz wurde mit einem Monitoring-System überwacht. Die Körpertemperatur der Mäuse wurde durch eine Wärmematte konstant bei 36–37 °C gehalten. Zur bildlichen Darstellung der Mäusegehirne wurde eine 2D Turbo Spin-Echo-Sequenz mit T2-Gewichtung (mit TR = 4200 ms und TE = 36 ms) verwendet. Zwischen dem olfaktorischen Bulbus und dem Kleinhirn wurden von rostral nach caudal 20 koronare Schnitte mit einer Schnittdicke von jeweils 0,5 mm, einem Sichtfenster mit 2,85 x 2,85 cm und einer Matrix mit 256 x 256 Pixel aufgenommen.

2.2.4.1 Berechnung des Läsionsvolumens

Innerhalb kurzer Zeit nach MCAO kommt es durch den Zusammenbruch der BHS zu einer Ödembildung in der ischämischen Hemisphäre (Neumann-Haefelin et al., 2000).

Das Ödem wird durch einen Wassereinfluss verursacht, welcher am T2-gewichteten MRT als hyperintenser (weißer) Bereich sichtbar ist (Abb. 5). Die Abmessung und Berechnung der Läsionsvolumina in den 20 koronaren Schnitten erfolgte mit dem Programm Analyze. Zusätzlich wurden mit dem Programm die Volumina der ganzen ipsilateralen und kontralateralen Hemisphären bestimmt. Die Wassereinlagerung in der ischämischen Hemisphäre führt ipsilateral zu einer Expansion und im gleichen Maße zu einer Kompression der kontralateralen Hemisphäre (Gerriets et al., 2004). Um von dem Läsionsvolumen mit Ödem auf das tatsächliche Volumen des lädierten Hirngewebes schließen zu können wurde zunächst ein Kompressionsfaktor F ermittelt (Gerriets et al., 2004; Loubinoux et al., 1997):

$$F = \frac{(HVi + HVc)/2}{HVc}$$

HVi steht für das Volumen der ipsilateralen und HVc für das Volumen der kontralateralen Hemisphäre. Von dem Volumen der ipsilateralen und der kontralateralen Hemisphäre wurde das Volumen des unkorrigierten Läsionsvolumen (LVu), also Läsion mit Ödem, abgezogen und mit dem Kompressionsfaktor F multipliziert, um zunächst das tatsächliche Volumen des intakten Gewebes zu berechnen. Das korrigierte Läsionsvolumen (LVk) wurde indirekt ermittelt, indem das Volumen des intakten Gewebes von dem Volumen der gesamten ipsilateralen und kontralateralen Hemisphäre abgezogen wurde (Gerriets et al., 2004):

$$LVk = HVi + HVc - (HVi + HVc - LVu) \cdot F$$

Die Ausschlusskriterien nach der Messung am MRT waren: a) Läsionsvolumen <15 mm³ und b) fehlender Infarkt oder ausschließlich subkortikaler Infarkt.

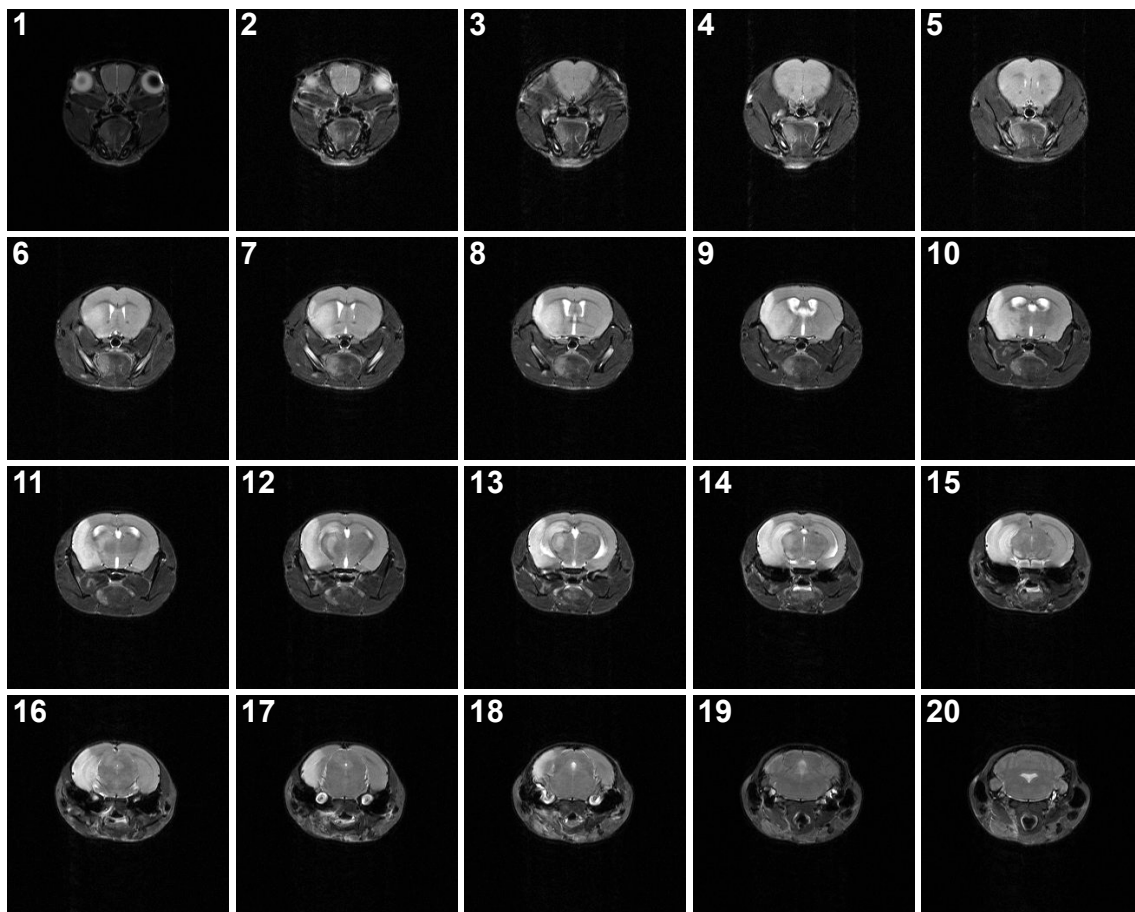


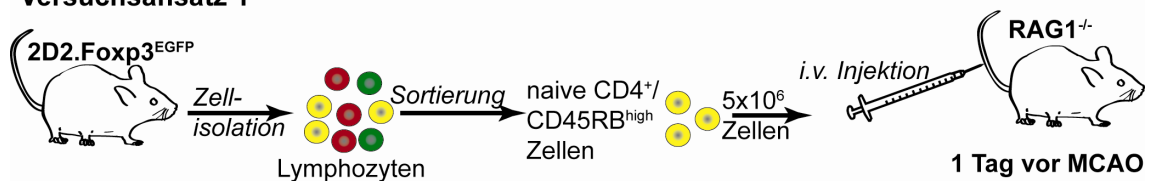
Abb. 5: Bildliche Darstellung der post-ischämischen Gehirne am MRT mit T2-Gewichtung. Exemplarische Darstellung eines Gehirns am Tag 5 nach MCAO. 20 koronare Schnitte mit Schnittdicke 0,5 mm wurden von rostral nach caudal (1–20) aufgenommen. Die Wassereinlagerung in der Läsion ist als hyperintensiver (weißer) Bereich zu sehen.

2.2.5 Zelltransfer in $RAG1^{-/-}$ Mäuse

Natürliche $Foxp3^{+}$ Tregs entstehen während der frühen Entwicklung eines Individuums im Thymus aus unreifen $CD4^{+}/CD8^{-}$ Thymozyten. Induzierbare $Foxp3^{+}$ Tregs können unter bestimmten Bedingungen aus naiven $CD4^{+}$ T-Zellen außerhalb des Thymus entstehen (Abb. 1; Sakaguchi et al., 2008). Zum Nachweis einer *de novo* Induktion $Foxp3EGFP^{+}$ Tregs nach MCAO wurden naive $CD4^{+}/CD45RB^{high}$ ohne $Foxp3EGFP^{+}$ Tregs sortiert und i.v. in $RAG1^{-/-}$ Mäuse transferiert. $RAG1$ Genprodukte sind erforderlich für die Rekombination der V(D)J-Segmente von T- und B-Zellrezeptoren. Durch eine Mutation im $RAG1$ Gen entwickelt die $RAG1^{-/-}$ Maus schon während des frühen Entwicklungsstadiums keine adulten T- und B-Zellen. (Mombaerts et al., 1992). Aus diesem Grund konnten am Tag 14 nach MCAO die lymphatischen Organe und Gehirnproben mit dem Durchflußzytometer auf *de novo* generierte $Foxp3EGFP^{+}$ Tregs hin überprüft werden. Hierfür wurden zwei Versuchsansätze durchgeführt. Im ersten Versuchsansatz wurden die naiven $CD4^{+}/CD45RB^{high}$ Zellen aus 2D2. $Foxp3EGFP$ Mäusen isoliert und in $RAG1^{-/-}$ Mäuse transferiert (Abb. 6). Die T-Zellen der 2D2. $Foxp3EGFP$ Maus besitzen einen spezifischen TCR gegen MOG, ein Bestandteil

des Myelins (Bettelli et al., 2003). Zusätzlich wird in dieser Maus das Reporterprotein EGFP unter der Kontrolle des Foxp3 Promoters exprimiert (Wang et al., 2008). In diesem Versuchsansatz sollte festgestellt werden, ob es zu einer MOG-spezifischen *de novo* Induktion Foxp3EGFP⁺ Tregs kommt, da nach einer MCAO Gehirnantigene in die Peripherie freigesetzt werden. In dem zweiten Versuchsansatz wurden naive CD4⁺/CD45RB^{high} Zellen aus Foxp3EGFP Reportermäusen isoliert und in RAG1^{-/-} Mäuse transferiert. Zusätzlich wurden B-Zellen aus dem C57BL/6J Stamm isoliert und gleichzeitig mit den naiven CD4⁺/CD45RB^{high} Zellen in die Empfängermaus transferiert (Abb. 6). In diesem Versuchsansatz enthielten die naiven CD4⁺/CD45RB^{high} Zellen das normale Wildtyp TCR-Repertoire des C57BL/6J Hintergrundstammes. Gleichzeitig sollte durch das Transferieren der B-Zellen die B-Zellkomponente der adaptiven Immunantwort nach einer MCAO in der RAG1^{-/-} Maus gewährleistet werden.

Versuchsansatz 1



Versuchsansatz 2

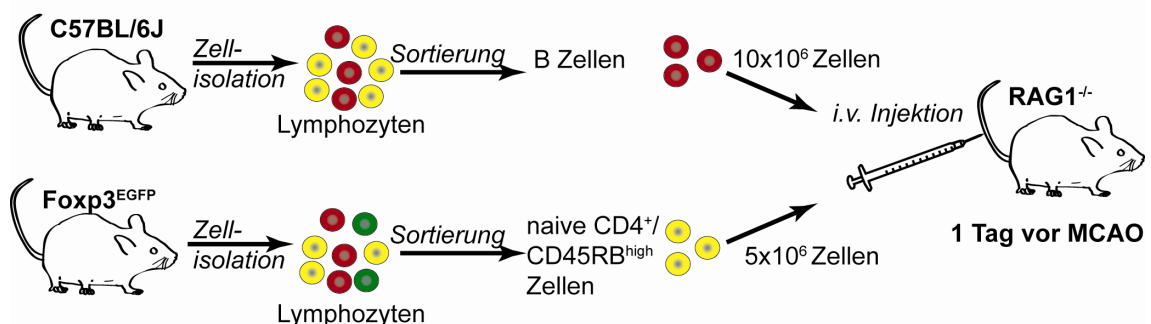


Abb. 6: Versuchsübersicht für zwei Versuchsansätze zum Nachweis der *de novo* Induktion von Tregs nach einer MCAO. Im ersten Versuchsansatz wurden aus 2D2.Foxp3EGFP Reportermäusen zunächst die Lymphozyten isoliert. Danach wurde aus den Lymphozyten, welche u.a. B Zellen (rot), naive CD4⁺/CD45RB^{high} Zellen (gelb) und Foxp3EGFP⁺ Tregs (grün) enthielten, naive CD4⁺/CD45RB^{high} Zellen isoliert und ein Tag vor der MCAO in RAG1^{-/-} Mäuse i.v. injiziert. Im zweiten Versuchsansatz wurden aus C57BL/6J Mäuse Lymphozyten isoliert und die B-Zellen raussortiert. Aus Foxp3EGFP Reportermäusen wurden Lymphozyten entnommen und die naiven CD4⁺/CD45RB^{high} Zellen isoliert. Die B-Zellen und naiven CD4⁺/CD45RB^{high} wurden ein Tag vor der MCAO in Rag1^{-/-} Mäuse i.v. injiziert.

2.2.5.1 Organentnahme und Verarbeitung

Die 2D2.Foxp3EGFP oder Foxp3EGFP Reportermäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Nach Öffnung des Bauchfells und der Peritoneums wurden zervikale, axilläre, inguinale und iliakale LK und Milz entnommen und in Zentrifugenröhrchen mit RPMI 1640 überführt. Die LK und die Milzen wurden durch

70 µm Zellsiebe unter Nachspülen von RPMI 1640 mechanisch dissoziiert. Die Zellsuspensionen wurden anschließend bei 300 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und die Überstände abgekippt. Das Zellpellet der LK wurde mit 10 ml MACS-Puffer suspendiert. Die Zellen wurden mit der Zählkammer gezählt und anschließend bei 4 °C aufbewahrt. Das Zellpellet der Milzen wurde mit 5 ml Zellysepuffer pro Milz mit dem Vortexer gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die 50 ml Zentrifugenröhrchen zum Abstoppen der Lysereaktion mit RPMI 1640 aufgefüllt. Die Milzproben wurden für 5 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Milzzellen in 10 ml MACS-Puffer je Zentrifugenröhrchen suspendiert und mit der Zählkammer die Zellzahl bestimmt.

2.2.5.2 Sortierung naiver CD4⁺ T-Zellen und Ausschluss Foxp3EGFP⁺ Tregs

Im nächsten Schritt wurden durch negative Selektion mit dem „CD4⁺ T Cell Isolation Kit“ von Miltenyi die CD4⁺ T-Zellen aus den Zellsuspensionen über magnetisierte LS-Säulen isoliert. In diesem Verfahren werden Immunzellen der Zellsuspension, welche zuvor mit biotinylierten Antikörpern und mit anti-Biotin-Microbeads markiert wurden, über eine magnetisierte LS-Säule von den CD4⁺ T-Zellen getrennt. Für die Markierung wurden die Zellsuspensionen aus den LK und Milzen zunächst so aufgeteilt, dass sich maximal $1,4 \times 10^8$ Zellen in einer Probe befinden, um somit ein Überladen der LS-Säulen zu verhindern. Die Zellsuspensionen wurden bei 300 x g (4 °C, 5 min) zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette vollständig entnommen. Die Zellen wurden in 40 µl MACS-Puffer je 1×10^7 Zellen resuspendiert und anschließend wurden 10 µl des Biotin-Antikörper-Cocktails je 1×10^7 Zellen hinzu gegeben und mit dem Vortexer gemischt. Nach 10 min Inkubation bei 4 °C wurden 30 µl MACS-Puffer und 20 µl anti-Biotin-Microbeads je 1×10^7 Zellen hinzugefügt und gemischt. Zum Waschen wurde nach 15 min Inkubation bei 4 °C das 10-fache der Reaktionslösung an MACS-Puffer hinzugefügt und bei 300 x g für 10 min und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl MACS-Puffer hinzugefügt und mit dem Vortexer gemischt. Die LS-Säule wurde im Magneten eingespannt und mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden auf die LS-Säule gegeben und die LS-Säule wurde in 4 Schritten mit je 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Der Durchfluss wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und mit der Zählkammer gezählt. Für die Analyse der Reinheit CD4⁺ T-Zellen in dem Durchfluss wurde ein kleiner Teil der Zellen für 15 min bei 4 °C mit anti-CD4-V500 (Konzentration 5 µg/ml) inkubiert, mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und am FACSCanto II gemessen. Der prozentuale Anteil CD4⁺ T-Zellen in der Lebendzellpopulation war stets über 90 % (Abb. 7A). Der restliche Durchfluss wurde bei 300 x g (4 °C, 5 min) zentrifugiert, der Überstand verworfen, mit

FACS-Puffer suspendiert und in FACS-Rundbodenröhrchen überführt. Die Zellen wurden für 15 min und bei 4 °C mit anti-CD45RB-PE (Verdünnung 1:100) inkubiert und mit FACS-Puffer bei 300 x g (4 °C, 5 min) zentrifugiert. Die mit CD45RB-PE markierten Zellen wurden an einem FACS Aria von BD Biosciences in der *Core-Facility* des DRFZ in Berlin sortiert. Zunächst wurden Dubletten in Dotplots mit Seitwärtsstreulicht-Weite (SSC-W) vs. Seitwärtsstreulicht-Höhe (SSC-H) und Vorwärtsstreulicht-Weite (FSC-W) vs. Vorwärtsstreulicht-Höhe (FSC-H) ausgeschlossen. Im nächsten Schritt wurde im Dotplot Foxp3EGFP vs. CD45RB-PE dargestellt. Es wurden die Foxp3EGFP⁻/CD45RB^{high} Zellen für die weitere Verwendung in neue FACS-Rundbodenröhrchen sortiert. Anschließend wurde die Reinheit der Foxp3EGFP⁻/CD45RB^{high} Zellen in den sortierten Zellen mit dem FACS Aria bestimmt. Der prozentuale Anteil Foxp3EGFP⁻/CD45RB^{high} Zellen lag über 99 % und der prozentuale Anteil Foxp3EGFP⁺ Zellen lag unter 0,035 % (Abb. 7B).

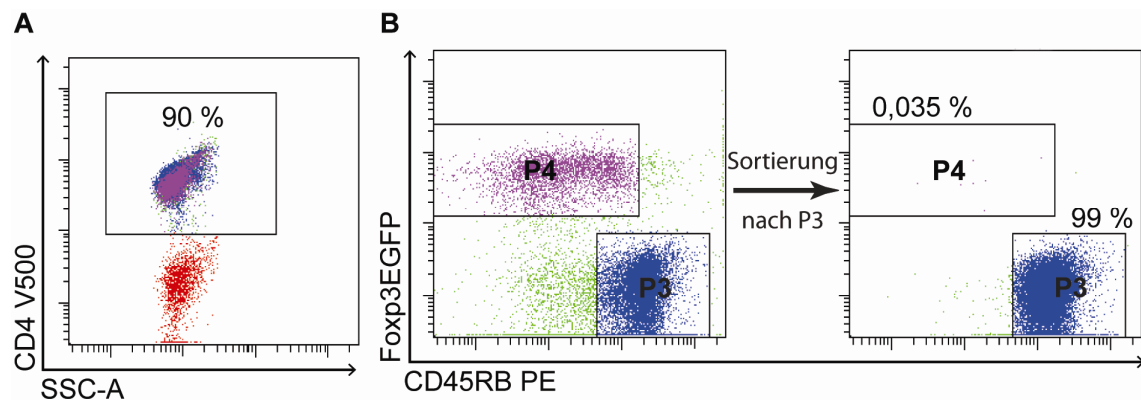


Abb. 7: Analyse am Durchflusszytometer zur Sortierung naiver CD4⁺ T-Zellen und Ausschluss Foxp3EGFP⁺ Tregs. (A) Die CD4⁺ T-Zellen wurden durch negative Selektion und Sortierung über magnetisierte LS-Säulen gewonnen. Die Reinheit der CD4⁺ T-Zellen lag nach Sortierung über 90 %. (B) Die über LS-Säulen gewonnenen CD4⁺ T-Zellen wurden anschließend am FACS Aria weiter sortiert. Im Foxp3EGFP vs. CD45RB PE Dotplot wurden Foxp3EGFP⁺ Tregs (P4) ausgeschlossen und Foxp3EGFP⁻/CD45RB^{high} Zellen (P3) für den adoptiven Zelltransfer gewonnen. Die Reinheit der Foxp3EGFP⁻/CD45RB^{high} Zellpopulation lag nach der Sortierung über 99 %. In der Zellsuspension waren unter 0,035 % der Zellen Foxp3EGFP⁺ Tregs.

2.2.5.3 Sortierung CD45R/B220⁺ B Zellen

Für die negative Selektion der B-Zellen wurde das „*EasySep mouse B cell enrichment kit*“ von Stemcell-Technologies verwendet. In diesem Verfahren werden Immunzellen im ersten Reaktionsschritt mit biotinylierten Antikörpern, dem Biotin-Selektions-Cocktail markiert und den Magnetpartikeln markiert. Die markierten Zellen werden durch einen Magneten von den unmarkierten Zellen, mit einem hohen B-Zellanteil, getrennt.

Aus C57BL/6J Mäusen wurden zunächst Milzen, wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben, entnommen, mechanisch dissoziiert und mit Zellysepuffer inkubiert. Die fertigen Zellsuspensionen aus den Milzen wurden gezählt und dann bei 300 x g (4 °C, 5 min)

zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Die Zellen wurden mit 1×10^8 Zellen pro ml FACS-Puffer, 5 % normales Rattenserum enthaltend, suspendiert. Es wurden 50 μ l des Antikörper-Cocktails pro ml Zellsuspension hinzugefügt und mit dem Vortexer gemischt. Nach einer Inkubation für 15 min bei 4 °C wurden 100 μ l Biotin-Selektions-Cocktail pro ml Zellsuspension hinzugefügt, gemischt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Im dritten Reaktionsschritt wurden 100 μ l der Magnetpartikel pro ml Zellsuspension hinzugefügt, gemischt und für 5 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit FACS-Puffer auf 2,5 ml aufgefüllt und in den *EasySep* Magneten gestellt. Nach 5 min wurde die Zellsuspension im Magneten in eine neues FACS-Rundbodenröhrchen gekippt. Zur Messung der Reinheit der B Zellen wurde ein kleiner Teil der abgekippten Zellsuspension mit anti-CD16/CD32 (Konzentration 10 μ l/ml), zum Blockieren des Fc-Rezeptors, inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit anti-CD45R/B220-PE (Konzentration 10 μ l/ml) für 15 min bei 4 °C inkubiert, bei 300 x g (4 °C, 5 min) gewaschen und am FACSCanto II gemessen. Der prozentuale Anteil der CD45R/B220⁺ B Zellen lag über 97 % (Abb. 8).

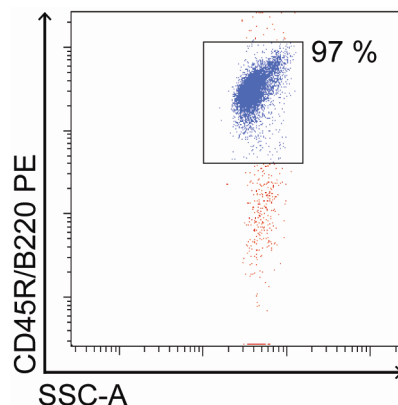


Abb. 8: Analyse am Durchflusszytometer nach Sortierung CD45R/B220⁺ B-Zellen aus der Milz. Durch negative Selektion wurde aus isolierten Milzzellen CD45R/B220⁺ B- Zellen gewonnen. Die Reinheit der CD45R/B220⁺ B-Zellen lag nach der Sortierung über 97 %.

2.2.5.4 Adoptiver Zelltransfer in RAG1^{-/-} Mäuse

Die FACS-Rundbodenröhrchen mit den CD4⁺/Foxp3EGFP⁻/CD45RB^{high} Zellen, welche als naive CD4⁺ T-Zellen bezeichnet wurden, und den CD45R/B220⁺ B Zellen wurden bei 300 x g bei 4° C für 5 min zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette komplett entnommen. Den RAG1^{-/-} Mäusen wurden jeweils 5×10^6 naive CD4⁺ T-Zellen und für den zweiten Versuchsansatz gleichzeitig 10×10^6 B Zellen in 200 μ l steriler 0,9 %ige NaCl-Lsg. über die Schwanzvene injiziert. Die Injektion der Zellen erfolgte einen Tag vor der MCAO. Die Aufarbeitung der Organe und Färbung der Zellsuspensionen für die Durchflusszytometrie 14 Tage nach MCAO erfolgte wie in Kapitel 2.2.7.1 beschrieben.

2.2.6 Depletion CD25⁺ Tregs nach MCAO

Das Ziel dieses Versuches war es den Einfluss CD25⁺ Tregs auf neurologische und funktionelle Endpunkte zu untersuchen. Hierfür wurde ein Antikörper gegen CD25, der α -Kette des IL-2-Rezeptors, 3 und 14 Tage nach MCAO Foxp3EGFP Reporter-mäusen i.p. injiziert. Die Depletion der CD25⁺ Tregs wurde am Tag 9 und Tag 30 nach MCAO mit einer durchflusszytometrischen Blutzellanalyse überprüft. Zusätzlich wurden am Tag 30 nach MCAO Gehirnproben und lymphatische Organe durchflusszytometrisch analysiert, um die Depletion in der Peripherie und im Gehirn zu überprüfen und um mögliche Wechselwirkungen der CD25⁺ Tregs mit Immunzellen im Gehirn zu untersuchen. Zur Analyse des neurologischen Verlaufs wurde 14 und 27 Tage nach MCAO eine Ganganalyse durchgeführt und 3 und 27 Tage nach MCAO die Entwicklung der Infarkt volumina durch Messungen am MRT überprüft. Eine Übersicht des Versuchsablaufs ist in Abb. 9 zusammengefasst.

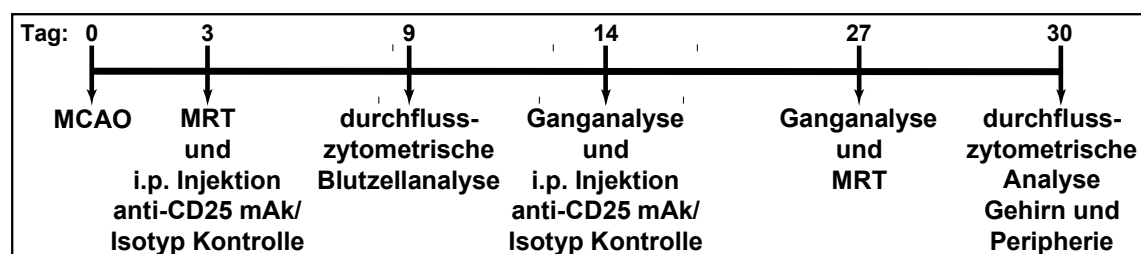


Abb. 9: Übersicht des Versuchsablaufs zur Untersuchung der Funktionalität CD25⁺ Tregs nach MCAO.

2.2.6.1 Injektion des Antikörpers anti-CD25 und des Isotyps IgG1

Der Antikörper gegen CD25 wurde von eBioscience (San Diego, CA, USA) erworben. An den Tagen 3 und 14 nach MCAO wurde den Mäusen jeweils 250 µg des Antikörpers gegen CD25 i.p. injiziert. Der Kontrollgruppe wurde in gleicher Menge der entsprechende Isotyp von eBioscience injiziert. Die Produktdaten des erworbenen Antikörpers und des Isotyps sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Produktdaten des Antikörpers gegen CD25 und des Isotyps zur Untersuchung der Funktionalität CD25⁺ Tregs.

Bezeichnung	Klon	Konzentration	Artikelnr.
Anti-Maus CD25 (aus Ratte)	PC61	1 mg/ml	102031
Ratten IgG1, Isotypkontrolle	RTK2071	1 mg/ml	400427

2.2.6.2 Zellanalyse mit dem Durchflusszytometer

Am Tag 9 nach MCAO wurde den Mäusen mit einer Lanzette Blut aus der *Vena facialis* entnommen und in EDTA-Lsg. überführt und wie in Kapitel 2.2.7.3 beschrieben weiter

aufgearbeitet und am Durchflusszytometer analysiert. Am Tag 30 nach MCAO erfolgte die Aufarbeitung der Organe, Färbung und Messung wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben.

2.2.6.3 MRT zur Untersuchung der Läsionsvolumen

Die Messungen am MRT erfolgten nach dem in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Verfahren. Die Auswertung der Läsionsvolumen am Tag 3 erfolgte über die Berechnung der korrigierten Läsionsvolumen, wie in Kapitel 2.2.4.1 erläutert. Am Tag 27 nach MCAO sind im T2-gewichteten MRT defektes und vernarbtes Gewebe sichtbar (Abb. 10). Zusätzlich ist die ischämische Hemisphäre atrophisch und Zerebrospinalflüssigkeit füllt Teile des dadurch entstandenen Leerraums auf (Royl et al., 2009). Zur Bestimmung des finalen Infarkt Volumens am Tag 27 wurden zunächst das Volumen des defekten und vernarbten Gewebes, sowie das Volumen der Leerräume von dem Volumen der gesamten ipsilateralen Hemisphäre abgezogen. Dann wurde von dem Volumen der gesamten kontralateralen Hemisphäre das zuvor bestimmte Volumen des gesunden Gewebes der ipsilateralen Hemisphäre abgezogen, um indirekt das Läsionsvolumen zu bestimmen (Abb. 10).

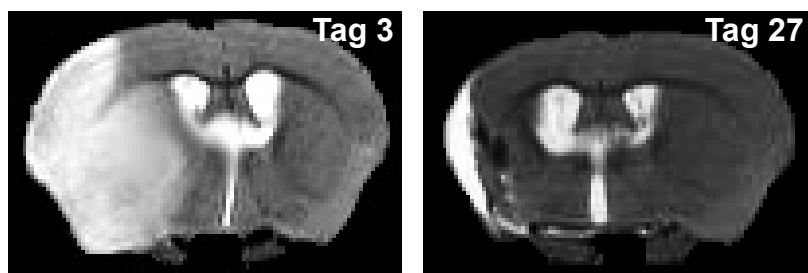


Abb. 10: Bildliche Darstellung des Infarktgebiets mit T2-gewichtetem MRT 3 und 27 Tage nach MCAO. Exemplarisch sind koronare Gehirnschnitte aus einer mit anti-CD25 behandelten Maus dargestellt. Am Tag 3 nach MCAO wurde die Läsion über die Wassereinlagerung mit dem MRT bildlich dargestellt und wie in Kapitel 2.2.4.1 berechnet. Am Tag 27 nach MCAO ist im MRT defektes und vernarbtes Gewebe in der ischämischen Hemisphäre zu erkennen. Zusätzlich sind atrophische Bereiche gefüllt mit Zerebrospinalflüssigkeit als hyperintense (weiße) Bereiche abgebildet. Zunächst wurde das Volumen des defekten und vernarbten Gewebes und des atrophisierten Gewebes gemessen und von der gesamten ipsilateralen Hemisphäre abgezogen, welches anschließend von dem Volumen der gesamten kontralateralen Hemisphäre abgezogen wurde, um am Tag 27 das indirekte Läsionsvolumen zu berechnen.

2.2.6.4 Ganganalyse

Für die Ganganalyse wurde *Catwalk 7.1*, eine computergestützte und automatisierte Methode von Noldus, verwendet. Die Ganganalyse wurde wie in Hetze et al. (2012) beschrieben durchgeführt. In diesem System laufen die Mäuse über eine 1,3 m lange und mit LEDs von innen beleuchtete Glasplatte. Das Licht wird im Ruhezustand im Inneren der Glasplatte reflektiert. Bei Kontakt der Pfoten mit der Glasplatte kommt es zu einer Brechung des Lichts und die Pfoten erscheinen als helle Stellen auf der unteren Seite der Glasplatte. Je stärker der Kontakt der Pfote mit der Glasplatte ist,

desto heller erscheint der Pfotenabdruck. Die Maus wird während des Laufs von der unteren Seite mit einer Hochgeschwindigkeitskamera aufgenommen und am Computer mit dem Programm Catwalk Version 7.1 analysiert. Vor der Aufnahme wurde zweimal mit den Mäusen trainiert, wobei der Mäusekäfig als Köder am Ende des Laufstegs positioniert wurde. Die erste Messung zur Bestimmung der Grundlinie wurde zwei Tage vor der MCAO durchgeführt. Zur Untersuchung des neurologischen Verlaufs nach einer Depletion CD25⁺ Tregs wurde an den Tagen 14 und 27 nach MCAO Messungen durchgeführt. Für die Messung wurden jeweils drei vollständige Läufe aufgenommen, welche eine minimale Laufdauer von 0,5 s und eine maximale Laufdauer von 5 s haben durften. Zusätzlich wurden nur Läufe berücksichtigt, die eine maximale Varianz von 60 % in der Geschwindigkeit hatten. Zusätzlich wurden keine Läufe berücksichtigt, in denen sich die Mäuse umdrehten oder rückwärts liefen. Folgende Parameter, die nach einer MCAO beeinträchtigt sind, wurden ausgewertet (Hetze et al., 2012):

1. Standzeit und maximale Kontaktfläche der beiden Vorder- und Hinterpfoten während des Laufs.
2. Parameter zu den Positionen der Pfotenabdrücke, wie Regularitätsindex und Duty-Cycle. Der Regularitätsindex gibt Auskunft über die Gleichmäßigkeit der Schrittsequenz bezogen auf den gesamten Lauf in %. Der Duty-Cycle wird in % angegeben und ist ein Maß für die relative Standphase einer Pfote bezogen auf den Schrittzklus.
3. Parameter zum zeitlichen Zusammenhang zwischen den Pfoten während des Laufs, wie Phasendispersion und normalisierte Schrittgeschwindigkeit. Phasendispersion ist der zeitliche Verlauf des initialen Kontakts einer Pfote (zum Beispiel rechte Hinterpfote) im Verhältnis zum initialen Kontakt einer anderen Pfote als Referenz (zum Beispiel linke Vorderpfote) und wird in % angegeben. Bei einer unbehandelten Maus läge die Phasendispersion in diesem Fall bei 0 %, da die Pfoten sich normalerweise in der Diagonale synchron zueinander bewegen. Die normalisierte Schrittgeschwindigkeit wird in mm angegeben und ist die Schrittgeschwindigkeit während des gesamten Laufs bezogen auf eine einzelne Pfote multipliziert mit der gesamten Laufdauer.

2.2.7 Durchflusszytometrie

Für die deskriptive Analyse der Immunzellen in lymphatischen Organen und im Gehirn mit dem Durchflusszytometer wurden ECL und MCAO behandelte Mäuse mit der entsprechenden Sham-Kontrolle 7, 14 und 30 Tage nach dem chirurgischem Eingriff verarbeitet. Die hierfür verwendeten Antikörper und Mausstämme werden in Kapitel 2.2.7.5 beschrieben. Zusätzlich wurde die Durchflusszytometrie für die in Kapitel 2.2.5

und Kapitel 2.2.6 beschriebenen Versuche verwendet. Die hierfür verwendeten Antikörper und Mausstämme sind ebenfalls in Kapitel 2.2.7.5 aufgeführt.

2.2.7.1 Organentnahme

Die Mäuse wurden durch i.p. Injektion des Ketamin/Rompun-Gemisches mit 10 µl/g Körpergewicht in tiefe Narkose gebracht, anschließend fixiert und das Fell und Peritoneum im Bauchbereich mit der Fellschere geöffnet. Das Diaphragma wurde entfernt und der Brustkorb seitlich aufgeschnitten, um das Herz freizulegen. Dann wurde die Perfusionspumpe über eine Kanüle mit der linken Herzkammer verbunden. Nach einem kleinen Schnitt in den rechten Vorhof wurden 30 µl Blut mit einer Pipette entnommen und in 500 µl EDTA-Lsg. (= 2 mM EDTA in PBS) überführt. Die Mäuse wurden dann mit 100 ml der 0,9 % NaCl-Lsg. für 15 min perfundiert, um das Blut aus dem Blutgefäßsystem zu entfernen. Nach der Perfusion wurden die oberflächlichen zervikalen LK, tiefen zervikalen LK, inguinalen LK und Milz in RPMI 1640 überführt. Die Schädeldecke wurde geöffnet und das Gehirn vollständig mit einem Spatel entnommen. Das Stammhirn und das Kleinhirn wurden entfernt. Nach ECL wurde das hintere Drittel des Gehirns mit einer Schere abgetrennt und in ipsilaterale Gehirnprobe mit Läsion und kontralaterale Gehirnprobe ohne Läsion aufgeteilt und in RPMI 1640 überführt. Bei der Sham-Kontrolle wurde der äquivalente Gehirnbereich aus der ipsilateralen Gehirnhemisphäre in RPMI 1640 überführt. Nach MCAO wurde die komplette ipsilaterale Hemisphäre mit ischämischem Infarkt und die komplette kontralaterale Hemisphäre ohne ischämischen Infarkt getrennt und jeweils in RPMI 1640 überführt. Bei der Sham-Kontrolle wurde die ipsilaterale Hemisphäre in RPMI 1640 überführt.

2.2.7.2 Zellgewinnung aus lymphatischen Organen

Die lymphatischen Organe wurden mit einem Spritzenstempel durch 70 µm Zellsiebe gedrückt und mit RPMI 1640 gespült, um die Zellen mechanisch zu dissoziieren. Die Zellsuspensionen wurden bei 300 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und einmalig mit 20 ml FACS-Puffer bei 300 x g für 5 min gewaschen. $1-5 \times 10^6$ Zellen aus den LK wurden dann für die Antikörper-Färbung mit FACS-Puffer in FACS-Rundbodenröhrchen überführt. Zur Lyse der Erythrozyten wurden die dissoziierten Milzzellen mit 5 ml Zellysepuffer je Probe gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das 50 ml Zentrifugenröhrchen mit RPMI 1640 aufgefüllt, bei 300 x g für 5 min zentrifugiert und überschüssiges Medium abgekippt. Nach einem weiteren Waschschrift mit FACS-Puffer wurden $1-5 \times 10^6$ Milzzellen mit FACS-Puffer in FACS-Rundbodenröhrchen für die Antikörper-Färbung überführt.

2.2.7.3 Zellgewinnung aus Blut

Das in EDTA-Lsg. gelöste Blut wurde mit 500 µl Histopaque-1083 unterschichtet und bei 500 x *g* und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befanden sich die mononukleäre Zellen aus dem Blut in der Interphase, also zwischen der EDTA-Lsg. und dem Histopaque-1083. Die Erythrozyten befanden sich am Boden des Reaktionsgefäßes. Die Interphase wurde mit einer Pinzette in FACS-Rundbodenröhrchen mit 2 ml FACS-Puffer überführt und bei 300 x *g* für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen für die Antikörper-Färbung in FACS-Puffer suspendiert.

2.2.7.4 Zellgewinnung aus Gehirnproben

Die Gehirnproben wurden mit einem Skalpell zerkleinert und mit einem Spritzenstempel unter Spülen mit RPMI 1640 durch 70 µm Zellsiebe gedrückt. Die Zellsuspensionen wurden bei 300 x *g* für 5 min bei RT zentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Zellpellet mit 5 ml 35 %iger Gradientenlösung suspendiert. In 15 ml Zentrifugenröhrchen wurde 4 ml der 70 %igen Gradientenlösung pipettiert und vorsichtig mit der 35 %igen Gradientenlösung überschichtet, so dass eine klare Phasengrenze zwischen beiden Gradientenlösungen sichtbar war. Die Gradientenlösungen wurden bei 600 x *g* für 30 min bei RT in einer Zentrifuge mit Schwenkrotor zentrifugiert. Die obere Phase mit Fettbestandteilen, Myelin und Zellresten wurde verworfen. Auf der Phasengrenze zwischen der unteren und der oberen Phase befanden sich mononukleäre Zellen, welche mit einer Pipette in Zentrifugenröhrchen überführt wurden (Abb. 11). Die Zentrifugenröhrchen wurden mit RPMI 1640 aufgefüllt und für 5 min bei 300 x *g* und RT zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in FACS-Puffer suspendiert und erneut bei 300 x *g* gewaschen. Die kompletten Zellen wurden mit FACS-Puffer für die Antikörper-Färbung in FACS-Rundbodenröhrchen überführt.

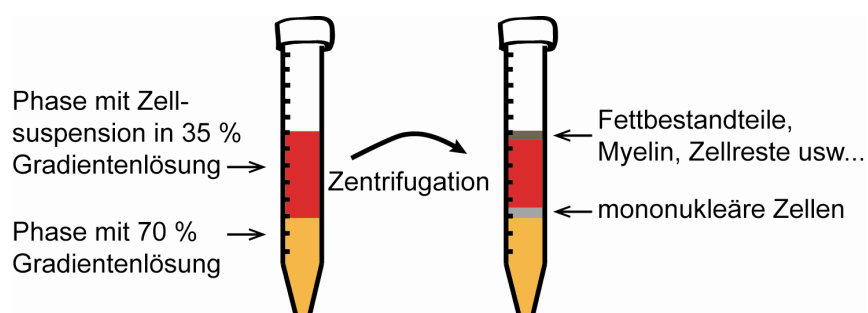


Abb. 11: Auftrennung der Gehirnbestandteile über den Dichtegradienten. Die Gehirnproben wurden in 35 % Gradientenlösung suspendiert und auf 70 % Gradientenlösung in Zentrifugenröhrchen pipettiert. Die Fett-, Myelinbestandteile und Zellreste befanden sich nach der Zentrifugation auf der oberen Phase und wurden verworfen. Die mononukleären Zellen auf der Phasengrenze zur 70 % Gradientenlösung wurden entnommen und für die Durchflusszytometrie verwendet.

2.2.7.4.1 Collagenase VIII zur chemischen Dissoziation

Collagenase VIII ist ein Enzym, welches für die chemische Dissoziation von Geweben verwendet wird, da es Kollagenstrukturen der extrazellulären Matrix und des Bindegewebes zersetzt. Neben der Collagenase enthält Collagenase VIII Proteasen, welche unspezifisch Kollagen und andere Proteinbestandteile zersetzen. Bei der Dissoziation der Gehirnproben wurde die Collagenase-Lsg. nur selektiv in Versuchen eingesetzt, da es einen Einfluss auf Epitope bei bestimmten Antikörperfärbungen haben kann. Collagenase VIII wurde bei der Isolation von Zellen aus ECL Gehirnen verwendet. Zusätzlich wurde Collagenase VIII bei MCAO Versuchen zur Charakterisierung von Mikroglia, Makrophagen und dendritischen Zellen und nach dem Transfer von T-Zellen in RAG1^{-/-} Mäuse eingesetzt. Collagenase VIII wurde nicht eingesetzt bei den Versuchen mit MCAO zur Charakterisierung von T-Zellen und zur durchflusszytometrischen Analyse von Gehirnproben nach einer Depletion der CD25⁺ Tregs mit dem anti-CD25 Antikörper.

Bei den Versuchen mit dem Einsatz der Collagenase VIII wurden zunächst die Gehirnproben mit dem Skalpell zerkleinert und nach der Zugabe von 10 ml RPMI bei 300 x g und RT für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde 1 ml der Collagenase-Lsg. zum Zentrifugenröhrchen mit der Gehirnprobe hinzugefügt, die Zellsuspension suspendiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 10 ml RPMI 1640 hinzugefügt und wie oben beschrieben (s. Kapitel 2.2.7.4) über ein 70 µm Zellsieb mechanisch dissoziiert und mit dem Dichtegradienten bis zur Antikörper-Färbung verarbeitet.

2.2.7.5 Allgemeines Protokoll zur Färbung der Oberflächenmarker

Vor der Färbung wurde für jeden Versuch ein entsprechender Antikörper-Mix in separaten Reaktionsgefäßen angefertigt (Tabelle 12). Die Verdünnung der Antikörper in dem Antikörper-Mix wurde so angesetzt, dass während der Färbung im FACS-Rundbodenröhrchen die jeweilige Konzentration (Tabelle 7) für die Färbereaktion vorliegt. Das Suspendieren der Zellen erfolgte stets mit dem Vortexer. Die Inkubationen mit den Antikörpern und Streptavidin erfolgten in einem Färbevolumen von 60 µl bis 100 µl und im Dunkeln.

Zunächst wurde anti-CD16/CD32, zum Blockieren des Fc-Rezeptors, auf die Proben in der Verdünnung 10 µg/ml gegeben, suspendiert und für 5 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Proben mit FACS-Puffer gewaschen. Hierfür wurde 1 ml FACS-Puffer auf die Proben gegeben und bei 300 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgekippt und der Antikörper-Mix auf die Proben gegeben, suspendiert und für 20 min bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden erneut mit FACS-Puffer gewaschen. In einem zweiten Färbeschritt wurden die Proben mit

Streptavidin-PerCP für 15 min bei 4 °C inkubiert, falls ein biotinylierter Primärantikörper verwendet wurde. Danach wurden die Proben mit FACS-Puffer gewaschen. Für die Messung am Durchflusszytometer wurden die Proben aus Blut und Gehirn jeweils in 100 µl FACS-Puffer suspendiert. Die Proben aus den LK und der Milz wurden für die Messung in 200 µl FACS-Puffer suspendiert.

Tabelle 12: Auflistung der Antikörper-Mixe und Mausstämme für Versuche in denen Messungen am Durchflusszytometer durchgeführt wurden. In der Tabelle sind die Zusammensetzung der unterschiedlichen Antikörper-Mixe und der jeweilige Verweis zu den Kapiteln im Ergebnissteil zusammengefasst.

Kapitel (im Ergebnissteil)	Mausstamm	Antikörper-Mix (Antigen- Fluorochrom)
3.1	Foxp3EGFP Reportermaus	CD11b-APC-Cy7, CD25-APC (Klon PC61), CD4-Alexa 700, CD45-PE-Cy7, CD8a-Pacific Blue, TCRβ-Biotin.
3.3.1 – 3.3.3	C57BL/6J	CD11b-APC-Cy7, CD25-APC (Klon PC61), CD4-V500, CD45-PE-Cy7, CD8a-Pacific Blue, Foxp3-PE, Ki-67-FITC, TCRβ-Biotin.
3.3.4 – 3.3.5	Foxp3EGFP Reportermaus	CD11b-APC-Cy7, CD25-APC (Klon PC61), CD4-V500, CD45-PE-Cy7, CD8a-Pacific Blue, Vβ8.1/8.2 TCR-Biotin, Vβ11 TCR-PE.
3.6	C57BL/6J	CD11b-APC, CD11c-FITC, CD45-PE-Cy7, MHCII (I-A/I-E)-PE
3.4	Empfänger: RAG1 ^{-/-} Spender: Foxp3EGFP-, 2D2.Foxp3EGFP Reportermaus und C57BL/6J	CD11b-APC-Cy7, CD25-APC (Klon PC61), CD4- V500, CD45-PE-Cy7, CD8a-Pacific Blue, CD45RB-PE, TCRβ-Biotin.
3.9	Foxp3EGFP Reportermaus	CD11b-APC-Cy7, CD25-APC (Klon 7D4), CD4-V500, CD45-PE-Cy7, CD8a-Pacific Blue, TCRβ-Biotin, MHCII (I-A/I-E)-PE

2.2.7.6 Intrazelluläre Färbung gegen Foxp3 und Ki-67

Für die intrazelluläre Färbung der Zellen mit anti-Foxp3 und anti-Ki67 wurden maximal 1×10^6 Zellen eingesetzt. Hierfür wurden zunächst die Zellzahlen der einzelnen Proben mit der Zählkammer bestimmt. Nach der Markierung der Oberflächenproteine mit dem Antikörper-Mix wurde zu den Proben jeweils 600 µl Fixierungs/Permeabilisierungs-Lsg. gegeben und gemischt. Die Proben wurden für 1 h bei 4 °C inkubiert, dann bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Auf die Proben wurden je 800 µl des Permeabilisierungs-Puffers gegeben und bei 300 x g zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde einmal wiederholt. Nach dem Waschen der Zellen wurde anti-CD16/CD32, zum Blockieren des Fc-Rezeptors, in der Konzentration 10 µl/ml auf die Proben gegeben und für 5 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde anti-Foxp3 und anti-Ki-67 in den jeweiligen Konzentrationen auf die Zellen gegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert.

Abschließend wurden die Zellen zweimal mit dem Permeabilisierung-Puffer bei 300 x g gewaschen und für die Messung in 100 µl FACS-Puffer suspendiert.

2.2.7.7 Kontrollfärbungen für die Durchflusszytometrie

Für jeden Marker wurden sog. Fluoreszenz-Minus-Eins (FMO)-Kontrollen angefertigt. In den FMO-Kontrollen wird jeweils ein Antikörper im Antikörper-Mix bei der Färbung ausgelassen. Somit ließ sich für jeden Marker die Negativpopulation definieren. Zusätzlich wurden für die Antikörper gegen Foxp3 und Ki-67 entsprechende Isotypkontrollen angefertigt.

2.2.7.8 Messung am Durchflusszytometer

Zu allen Antikörper-Mixen wurden separate Kompensationen am Durchflusszytometer vorgenommen. Diese erfolgten mit der Hilfe von Einzelfärbungen der BD Kompensations-Beads oder Lymphozyten aus LK.

Die Messungen am Durchflusszytometer erfolgten am gleichen Tag nach der Färbung mit den Antikörpern. Bei Färbungen mit dem CD4-Alexa 700 Antikörper erfolgte die Messung am BD LSRII Durchflusszytometer, da dieses eine passende Filter-Konfiguration für das Alexa 700 Fluorochrom besitzt. Bei Antikörper-Mixen mit CD4-V500 und ohne CD4 Färbung erfolgte die Messung am FACSCanto II. V500 ist ein neues, von BD entwickeltes Fluorochrom, welches durch den violetten Laser angeregt wird.

Bei den Gehirnproben wurde die vollständige Probe am Durchflusszytometer gemessen, um die absolute Zellzahl nach Isolation ermitteln zu können.

2.2.8 Immunhistochemie

Aus 3–4 Foxp3EGFP Reportermäusen wurden je Gruppe an den Tagen 7, 14 und 30 nach ECL und MCAO die Gehirne und Milzen für die Immunhistochemie aufgearbeitet.

2.2.8.1 Organentnahme und Kryokonservierung

Die Perfusion wurde wie in Kapitel 2.2.7.1 beschrieben durchgeführt. Nach der Perfusion mit 100 ml NaCl-Lsg. wurde die Maus mit weiteren 30 ml eiskaltem PFA 4 % für 5 min perfundiert. Dann wurde die Milz entnommen und in ein Zentrifugenröhrchen mit 5 ml eiskaltem PFA 4 % gegeben. Die Schädeldecke wurde mit der Fellschere geöffnet und das gesamte Gehirn mit einem löffelförmigen Spatel entnommen und ebenfalls in 5 ml eiskaltes PFA 4 % gegeben. Die Organe wurden über Nacht bei 4 °C im PFA 4 % gelassen. Anschließend wurden die Organe jeweils über Nacht bei 4 °C in 10 %, 20 % und 30 % Sucrose-Lsg. gegeben. Nach der Sucrose-Reihe wurden die Organe kryokonserviert. Hierfür wurde zunächst 2-Methylbutan mit Trockeneis auf -60 °C herunter gekühlt. Anschließend wurden die Organe für 30 s in das

2-Methylbutan gegeben und danach auf Filterpapier gelegt, um das überschüssige 2-Methylbutan zu entfernen. Die eingefrorenen Organe wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.8.2 Anfertigung der Kryoschnitte

Aus den kompletten Gehirnen mit ECL wurden 12 µm dicke horizontale Schnitte angefertigt. Aus den kompletten Gehirnen mit MCAO wurden 12 µm dicke Frontalschnitte angefertigt. Von den Milzen wurden 12 µm dicke Querschnitte angefertigt. Die Organe wurden mit einem kleinen Tropfen Einbettmedium auf der Schneidevorrichtung des Kryostats befestigt. Die Organe wurden während des Schneidevorgangs auf Temperaturen zwischen -20 °C und -23 °C gebracht. Pro Objektträger mit Adhäsionsbeschichtung wurden von den Gehirnen 4–5 Schnitte und von den Milzen 3 Schnitte angefertigt. Die Kryoschnitte wurden bis zur Färbung bei -80 °C gelagert.

2.2.8.3 Allgemeines immunhistochemisches Färbeprotokoll

Die Schnitte wurden auf RT gebracht, an der Luft getrocknet und auf dem Objektträger mit dem Fettstift umrandet, um ein Zerlaufen der Reaktionslösungen zu verhindern. Die Schnitte wurden mit zweimal PBS gewaschen, für 15 min bei RT mit PTX 0,2 % permeabilisiert und anschließend mit 5 %iger Blocklösung für 45 min bei RT inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Danach wurde die Färbung mit den Primärantikörpern und Sekundärantikörpern durchgeführt. Die Verdünnungen für die Färbereaktion sind in Tabelle 8 und Tabelle 9 aufgelistet. Die Inkubation zur Färbung mit Antikörpern fand bei 4 °C statt. Falls nicht anders beschrieben, fand die Färbung mit den Primär- und Sekundärantikörper in 5 %iger Blocklösung statt. Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die Schnitte jeweils dreimal mit PTX 0,2 % gewaschen. Am Ende des Färbeprotokolls wurden die Schnitte mit DAPI für 10 min bei RT inkubiert, um die Nukleinsäure in Zellkernen zu markieren. Danach wurden die Schnitte einmal mit PTX 0,2 % und zweimal mit PBS gewaschen. Die gefärbten Schnitte wurden mit Immu-Mount eingedeckt und mit Deckgläsern versiegelt. Die Lagerung der gefärbten Schnitte erfolgte bei 4 °C.

2.2.8.4 Färbeprotokoll mit Antikörpern gegen CD4 und GFP

Gehirnschnitte und Milzen MCAO Mäusen wurden gegen CD4 und GFP gefärbt. Im ersten Färbeschritt wurden anti-CD4 aus Ratte und anti-GFP aus Kaninchen auf die Schnitte gegeben. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach den Waschschritten mit PTX 0,2 % wurden die Schnitte mit anti-Ratte Alexa 568 und anti-Kaninchen Alexa 488 für 4 h inkubiert.

2.2.8.5 Färbeprotokoll mit Antikörpern gegen GFP, MHCII und Iba1

Die Färbung mit Antikörpern gegen GFP, MHCII und Iba1 wurde an Gehirn- und Milzschnitten aus ECL und MCAO Mäusen durchgeführt.

Im ersten Färbeschritt wurden die Schnitte mit anti-MHCII aus Ratte und anti-GFP aus Huhn über Nacht inkubiert. Nach dem Waschen erfolgte die Inkubation mit anti-Ratte Alexa 633 und anti-Huhn FITC für 4 h. Die Schnitte wurden erneut gewaschen und mit anti-Iba1 aus Kaninchen über Nacht inkubiert. Im letzten Färbeschritt wurde anti-Kaninchen für 4 h auf die Schnitte gegeben.

2.2.8.6 Färbeprotokoll mit Antikörpern gegen GFP, MHCII und CD11c

Die Färbung mit Antikörpern gegen GFP, MHCII und CD11c wurde an Gehirn- und Milzschnitten von MCAO Mäusen durchgeführt.

Im ersten Färbeschritt wurde anti-MHCII aus Ratte zusammen mit anti-GFP aus Huhn auf die Schnitte gegeben und über Nacht inkubiert. Nach dem Waschen wurden anti-Ratte Alexa 633 und anti-Huhn FITC für 4 h mit den Schnitten inkubiert. Der biotinylierte anti-CD11c wurde in PTX 0,2 %, also ohne Normales Ziegenserum, auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach den Waschschritten erfolgte 4 h Inkubation mit Streptavidin Alexa 568 in Blocklösung.

2.2.8.7 Färbeprotokoll mit Antikörpern gegen GFP, CD4 und Laminin

Die Färbung wurde an Gehirnschnitten von MCAO Mäusen durchgeführt. Zunächst wurde der Antikörper aus Huhn gegen Laminin in PTX 0,2 % auf die Schnitte gegeben und über Nacht inkubiert. Die Schnitte wurden gewaschen und mit anti-Huhn Alexa 633 für 4 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit anti-CD4 aus Ratte und anti-GFP aus Kaninchen über Nacht. Nach den drei Waschschritten mit PTX 0,2 % wurden die Schnitte mit anti-Ratte Alexa 568 und anti-Kaninchen Alexa 488 in Blocklösung für 4 h inkubiert.

2.2.8.8 Kontrollfärbungen

Die Färbungen der Milzen dienten als Positivkontrolle für die Antikörper gegen GFP, CD4, MHCII, CD11c und Iba1. Die kontralateralen Hemisphären dienten als Negativkontrolle für die Antikörper gegen GFP, CD4, MHCII und CD11c. In den Negativkontrollen wurde bei keinem der Antikörper eine positive Reaktivität im Parenchym festgestellt. Durch das Weglassen der primären Antikörper während der Färbung wurde eine Kreuzreaktivität der sekundären Antikörper mit dem lädierten neuronalem Gewebe ausgeschlossen. Ratten IgG2b κ wurde als Isotypkontrolle für MHCII und biotinyliertes IgG aus armenischem Hamster als Isotypkontrolle für CD11c verwendet. Die Kontrollen zeigten keine positive Reaktivität mit dem Zielgewebe.

2.2.8.9 Mikroskopie

Von den Gehirnschnitten wurden konfokale Aufnahmen am Leica TCS-SL und am Zeiss LSM5 Exciter angefertigt. Weißlichtaufnahmen der Gehirnschnitte wurden am Olympus BX 51 angefertigt.

2.2.9 TaqMan Real-Time PCR

Für die TaqMan Real-Time PCR wurde 7, 14 und 30 Tage nach MCAO und Sham-Operation die Expression verschiedener Zielgene im Gehirn von C57BL/6J Mäusen untersucht.

2.2.9.1 Organentnahme

Die Mäuse wurden durch i.p. Injektion mit 10 µl/g Körpergewicht des Ketamin/Rompun-Gemisches in tiefe Narkose gebracht. Anschließend wurden die Mäuse wie in Kapitel 2.2.7.1 beschrieben mit 0,9 % NaCl-Lsg. perfundiert. Die Schädeldecke wurde geöffnet und das Gehirn entnommen. Das Kleinhirn und das Stammhirn wurden entfernt. Mit einer Schere wurden die ischämische Hemisphäre und die kontralaterale Hemisphäre getrennt und jeweils in Reaktionsgefäße überführt. Die geschlossenen Reaktionsgefäße mit den Hemisphären wurden zum Schockgefrieren in Flüssigstickstoff gegeben. Die Hemisphären wurden bis zur RNA-Isolation bei -80 °C gelagert.

2.2.9.2 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation aus den Gehirnhemisphären wurde das „RNeasy Midi Kit“ von Qiagen, einem säulenbasierten Extraktionsverfahren, verwendet. Das Gewicht der Hemisphären lag bei 145 mg. Zu der Gesamt-RNA gehören ribosomale RNA (rRNA), transfer-RNA (tRNA) und Boten-RNA (mRNA). Für die Isolierungsprozedur wurde nur RNase freies Material (Lösungen, Reaktionsgefäße und Arbeitsplatz) verwendet. Es wurde strikt nach dem vorgegebenen Protokoll von Qiagen (Stand Juni 2001) vorgegangen.

Die Hemisphären wurden zunächst in Zentrifugenröhrchen (15 ml) mit 4 ml des Lysispuffers (RLT-Puffer) gegeben und anschließend für 45 s mit dem Rotor-Stator homogenisiert. Das Lysat wurde bei 3000 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt. Es wurde 1 ml 70 %iges Ethanol hinzugefügt und die Probe durch Schütteln gemischt. Anschließend wurden die Proben nach den Angaben von Qiagen über die Säulen aufgereinigt. Zum Schluss wurde die RNA mit 500 µl aqua dest. (Typ II) in ein Reaktionsgefäß eluiert. RNA besitzt ein Absorptionsmaximum bei 260 nm Wellenlänge und durch die Bestimmung der optischen Dichte mit dem Spektrophotometer lässt sich in der Form die Konzentration berechnen. Weiterhin wurde eine Verunreinigung der Proben durch Proteine mit einer

Absorptionsmessung bei 280 nm ausgeschlossen. Das Zahlenverhältnis der Messungen bei 260 nm und 280 nm ($A_{260}/280$) sollte in Proben ohne Kontamination durch Proteine zwischen 1,9 und 2,1 liegen (Wilfinger et al., 1997).

2.2.9.3 Herstellung der komplementären DNA

Mit der reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierfür wurde das „*Quantitect Reverse Transcription Kit*“ von Qiagen verwendet und nach dem Protokoll im Handbuch (Stand Januar 2009) vorgegangen. Für die Herstellung der cDNA wurden für jede Probe 2 µg RNA verwendet. Die Proben und Lösungen wurden stets auf Eis gelagert. Im ersten Schritt wurde die zu transkribierende RNA mit *gDNA Wipeout Buffer* von genomischer DNA befreit. Hierfür wurde zu 4 µl des *gDNA Wipeout Buffer* 2 µg RNA gegeben und auf ein Gesamtvolumen von 28 µl mit RNase freies aqua dest. aufgefüllt. Die Proben wurden für 2 min bei 42 °C inkubiert und wieder auf Eis gestellt. Es wurde ein Mastermix aus reverser Transkriptase mit 2 µl/Probe, 5x *RT Puffer* (8 µl/Probe) und *RT Primermix* (2 µl/Probe) angefertigt und auf die RNA-Proben pipettiert. Zur Kontrolle wurde für jeden Versuchsdurchlauf ein Ansatz ohne reverse Transkriptase angefertigt. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei 42 °C. Die reverse Transkriptase wurde mit 3 min bei 95 °C inaktiviert. Die Proben mit cDNA wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.9.4 TaqMan Real-Time PCR

Für die Messung der transkribierten cDNA aus der mRNA der Zielgene wurde das Detektionssystem ABI Prism 7500 FAST von Applied Biosystems verwendet. Mit diesem Detektionssystem lässt sich durch die Zugabe einer definierten Menge spezifischer Primerpaare und Sonden zu den Proben die exponentielle Amplifikation der Zielsequenz in Echtzeit detektieren. Die Sonde besteht aus Oligonukleotiden mit einem Reporter-Farbstoff am 5'-Ende. An dem 3'-Ende der Sonde befindet sich eine Quencher, welcher fortwährend die Emission des Reporterfarbstoffs nach einer Anregung im 488 nm Wellenlängenbereich unterdrückt. Während der Hybridisierung lagern sich die Sonde und die Primer an spezifische Sequenzbereiche des Zielgens an. Während der Elongationsphase wird das PCR-Produkt synthetisiert und es kommt zeitgleich zu einer Verdrängung der Sonde durch die Taq-Polymerase. Daraus resultiert eine Veränderung der Sekundärstruktur der Sonde, was wiederum zu einer Aktivierung der AmpliTaq DNA Polymerase führt und dies wiederum zu einem Schneiden der Sonde. Danach besteht keine räumliche Nähe des Reporter-Farbstoffs zum Quencher mehr und der Reporter-Farbstoff emittiert detektierbares Fluoreszenzlicht. Die Fluoreszenzintensität steigt somit entsprechend der Akkumulation des PCR-Produkts an.

Alle Primer und Sonden wurden im „*TaqMan Gene Expression Assay*“ von Applied Biosystems erworben (Tabelle 13). Das Mischungsverhältnis vom Primer zur Sonde wurde zuvor von Applied Biosystems für die jeweiligen Primer eingestellt und getestet. Bei allen Sonden wurde der Reporter-Farbstoff FAM, mit der chemischen Bezeichnung 6-Carboxy-Fluorescein, verwendet. FAM hat bei 488 nm Anregung ein Emissionsmaximum bei 518 nm. Die Reagenzien für die Real-Time PCR wurden in 96-Well-Platten wie in Tabelle 14 aufgelistet pipettiert. Für jeden Primer wurde pro untersuchte Probe die Messung zweifach durchgeführt. Zusätzlich wurde für jeden Versuchsdurchlauf eine Probe ohne reverser Transkriptase bei der cDNA-Herstellung und eine Probe mit aqua dest. (Typ II) anstelle der cDNA als Kontrollen mitgeführt.

Tabelle 13: Von Applied Biosystems erworbene „TaqMan Gene expression assays“, welche spezifische Primer für das Zielgen und die mit FAM gekoppelte Sonde enthielten.

Bezeichnung (Gen-Symbol)	Gen-Name	Artikelnummer
CXCR3	chemokine (C-X-C motif) receptor 3	Mm00438259_m1
CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7	Mm00432608_m1
DC-LAMP	lysosomal-associated membrane protein 3	Mm00616604_m1
DC-SIGN	CD209a antigen	Mm00460067_m1
HPRT	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	Mm01545399_m1
IFN- γ	interferon gamma	Mm01168134_m1
IL-2	interleukin 2	Mm00434256_m1
ILT3	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 4	Mm00496572_m1
MHCII	histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1	Mm01271198_m1

Tabelle 14: Pipettiervolumen der Reagenzien für die Real-Time PCR bei einer einfachen Messung.

Reagenz	Volumen
PCR Master-Mix	10 μ l
Aqua dest. (Typ II)	8 μ l
Primer/Sonde	1 μ l
cDNA	1 μ l

2.2.9.5 Relative Quantifizierung mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode

Der C_T -Wert steht für den Schwellenwert-Zyklus. Dieser Wert drückt die Zyklenzahl aus bei der zum ersten Mal eine Emission des Report-Fluoreszenzfarbstoffs über der Grundlinie erfasst wird. Je höher die Ausgangszahl der cDNA für eine Zielsequenz in der Probe ist, desto niedriger ist der C_T -Wert. Zur Normalisierung des C_T -Werts der Zielsequenzen wurde dieser mit dem C_T -Wert des Haushaltsgen HPRT subtrahiert. Zur relativen Quantifizierung der Zielsequenzen, bezogen auf die Kontrollhemisphären, wurden die normalisierten C_T -Werte aus ischämischen Hemisphären von den normalisierten C_T -Werten aus kontralateralen Hemisphären oder Sham-Hemisphären subtrahiert und die relative Expression mit $2^{-\Delta\Delta C_T}$ berechnet (Livak and Schmittgen, 2001).

2.2.10 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden die Programme GraphPad-Prism Version 5.0 und SPSS Version 15.0.1 verwendet. Bei dem Vergleich der Mittelwerte wurden zunächst die Gruppen auf eine Normalverteilung hin untersucht. Hierfür wurde der D'Agostino und Pearson Test verwendet. Da bei den Gruppen von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, wurden parametrische Tests zum Vergleich der Mittelwerte verwendet. Für den Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen wurde der Student t -Test verwendet. Bei dem Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine ANOVA Varianzanalyse durchgeführt. Konnte bei den Gruppen von einer Varianzhomogenität ausgegangen werden, wurde der Tukey Post Hoc Test zum multiplen Vergleich der Gruppen angefügt. Der Dunnett Post Hoc Test fand Verwendung bei dem Vergleich mehrerer Gruppen mit einer definierten Kontrollgruppe. Lag eine Varianzheterogenität zwischen den Gruppen vor, wurde der Post Hoc Test Games-Howell verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Durchflusszytometrie nach entorhinaler Kortexläsion

In diesem Versuch wurden Gehirnproben und lymphatische Organe aus Foxp3EGFP Reportermäusen nach ECL untersucht. Das Ziel dieses Versuchs war es, die Akkumulation CD4⁺ T-Zellen und Foxp3EGFP⁺ Tregs im Gehirn an den Tagen 7, 14 und 30 nach ECL zu quantifizieren und mit der Peripherie zu vergleichen. Hierfür wurden Zellsuspensionen aus tiefen zervikalen LK, zervikalen LK, Milz, und dem ipsilateralen und kontralateralen Läsionsareal entnommen und am Durchflusszytometer analysiert. Die Strategie zum setzen der Analysefenster und Quadranten ist in Abb. 12 dargestellt. Demnach wurde im ersten Dotplot der Marker CD45 gegen das Seitwärtsstreulicht (SSC-A) dargestellt und die Lymphozytenpopulation ausgewählt. CD45 ist ein membranständiges Protein und wird in der Durchflusszytometrie als Pan-Leukozytenmarker eingesetzt (Altin and Sloan, 1997). Lymphozyten sind mithilfe des Markers CD45 und anhand der Granularität von anderen Leukozyten im Gehirn unterscheidbar. Nachfolgend wurden monozytäre CD11b⁺ Immunzellen ausgeschlossen und über die Markierung der β -Kette des TCR die T-Zellen identifiziert. In der weiteren Analyse wurde mit einem Quadrant die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bestimmt. CD4⁺/Foxp3EGFP⁺ Tregs wurden anhand der Expression von CD4 und EGFP, dem unter der Kontrolle des Foxp3 Promotors exprimierten Reporterproteins, identifiziert (Abb. 12).

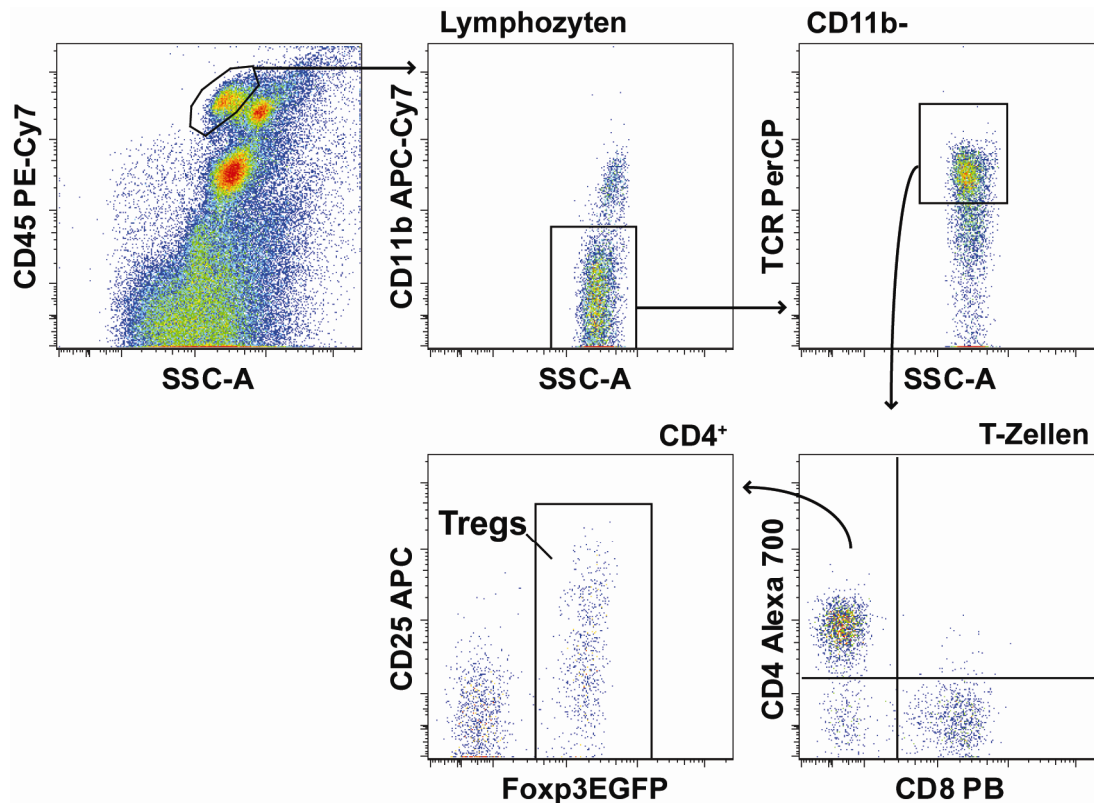


Abb. 12: Analyse CD4⁺ T-Zellen und Foxp3EGFP⁺ Tregs mit dem Durchflusszytometer. Die Abbildung zeigt die Strategie zum setzen der Analysefenster und Quadranten in den Dotplots. Die Achsen sind mit dem jeweiligen Marker und konjugierten Fluorochrom beschriftet. Die durchflusszytometrischen Daten wurden aus einer Zellsuspension des ipsilateralen Läsionsareals am Tag 14 nach ECL aufgenommen. Im CD45 vs. SSC-A Dotplot wurde das Analysefenster auf die CD45^{high}/SSC-A^{low} Lymphozyten gesetzt. Im nächsten Dotplot wurden die monozytären CD11b⁺ Zellen ausgeschlossen. Anschließend wurden die TCRβ⁺ T-Zellen ausgewählt. In der TCRβ-Population wurde im linken oberen Quadrant die CD4-Population ausgewählt und anschließend die Foxp3EGFP⁺ Tregs-Population bestimmt.

3.1.1 CD4⁺ T-Zellen und Foxp3⁺ Tregs akkumulieren nach ECL im Gehirn

Zunächst wurde die absolute Zellzahl der CD4⁺ T-Zellen und Foxp3EGFP⁺ Tregs im Gehirn nach ECL bestimmt und die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) ermittelt (Abb. 13). An den Tagen 7 und 30 nach ECL war ipsilateral im Vergleich zu den jeweiligen kontralateralen Hemisphären und Sham-Kontrollen kein signifikanter Anstieg der Anzahl CD4⁺ T-Zellen zu sehen. Dafür war am Tag 14 nach ECL mit 731 ± 400 CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zum kontralateralen Bereich (164 ± 198 CD4⁺ T-Zellen) ein signifikanter Anstieg zu sehen (Abb. 13A). Die Foxp3EGFP⁺ Tregs waren ipsilateral am Tag 14 mit 299 ± 185 Zellen im Vergleich zur kontralateralen Seite (25 ± 17 Zellen) und Sham-Kontrolle (36 ± 57 Zellen) signifikant erhöht (Abb. 13B). Am Tag 7 war ipsilateral keine erhöhte Akkumulation Foxp3EGFP⁺ Tregs festzustellen. Am Tag 30 war die Anzahl Tregs mit 192 ± 146 Zellen im Vergleich zum kontralateralen Bereich (41 ± 24 Zellen), jedoch nicht zur Sham-Kontrolle (43 ± 19 Zellen), signifikant erhöht (Abb. 13B).

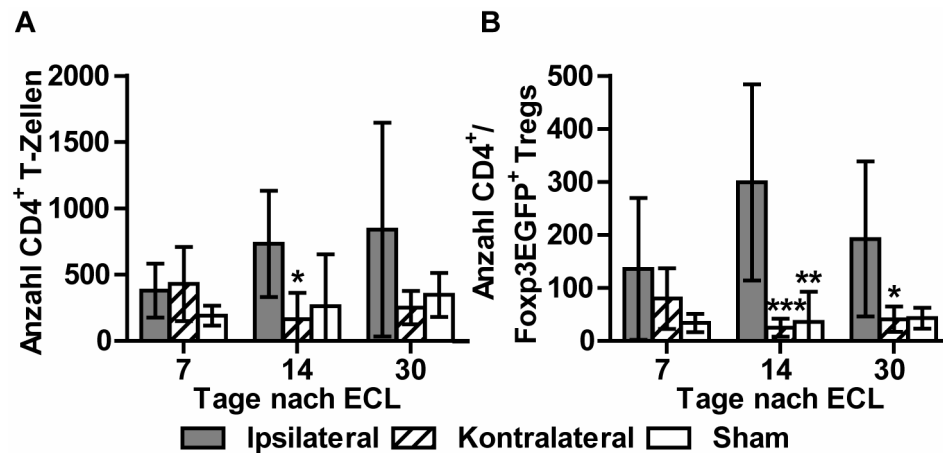


Abb. 13: Akkumulation CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺/Foxp3EGFP⁺ Tregs im Gehirn nach ECL. 7, 14 und 30 Tage nach ECL wurde die absolute Zellzahl der (A) CD4⁺ T-Zellen und (B) CD4⁺/Foxp3EGFP⁺ Tregs bestimmt. Vergleich der ipsilateralen Hemisphären mit kontralateralen Hemisphären und Hemisphären aus der Sham-Kontrolle mit dem Vergleichstest ANOVA (Post Hoc Test Dunett; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001). Ipsilaterale Hemisphären von den Tagen 7, 14 und 30 nach ECL wurden mit ANOVA und dem Post Hoc Test Games-Howell in (A) oder Tukey in (B) verglichen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt. Für ECL n = 6–7 pro Tag und für Sham-Kontrolle n = 3–5 pro Tag.

Im nächsten Schritt wurde der prozentuale Anteil Foxp3EGFP⁺ Tregs in der CD4-Population bestimmt und die Mittelwerte \pm SD im Gehirn und der Peripherie verglichen (Abb. 14A und Abb. 14B). In Abb. 14C sind repräsentative Dotplots der CD4-Population mit dem Analysefenster auf der Foxp3EGFP⁺ Tregs-Population von ipsilateralen Läsionsarealen 7, 14 und 30 Tage nach ECL dargestellt. Interessanterweise war ipsilateral am Tag 14 mit $37,7 \pm 5,2$ % der Anteil Foxp3EGFP⁺ Tregs im Vergleich zur kontralateralen Seite ($20,5 \pm 7,7$ %), Sham-Kontrolle ($14,0 \pm 5,8$ %) und den tiefen zervikalen LK ($13,9 \pm 5,0$ %), zervikalen LK ($14,0 \pm 2,5$ %) und Milz ($10,6 \pm 3,8$ %) stark erhöht. Ebenfalls war der prozentuale Anteil Foxp3EGFP⁺ Tregs am Tag 14 im Vergleich zu Tag 7 ($23,0 \pm 7,4$ %) und Tag 30 ($25,7 \pm 7,0$ %) signifikant erhöht (Abb. 14A und Abb. 14B). Am Tag 30 war mit $25,7 \pm 7,0$ % der Anteil Foxp3EGFP⁺ Tregs im Vergleich zum kontralateralen Bereich ($16,2 \pm 3,6$ %), zur Sham-Kontrolle ($12,6 \pm 0,6$ %) und zu den tiefen zervikalen LK ($11,8 \pm 6,2$ %), zervikalen LK ($14,5 \pm 3,0$ %) und der Milz ($11,5 \pm 3,2$ %) erhöht (Abb. 14A und Abb. 14B). Am Tag 7 war der prozentuale Anteil Foxp3EGFP⁺ Tregs ausschließlich im Vergleich zur Milz ($14,3 \pm 3,4$ %) erhöht.

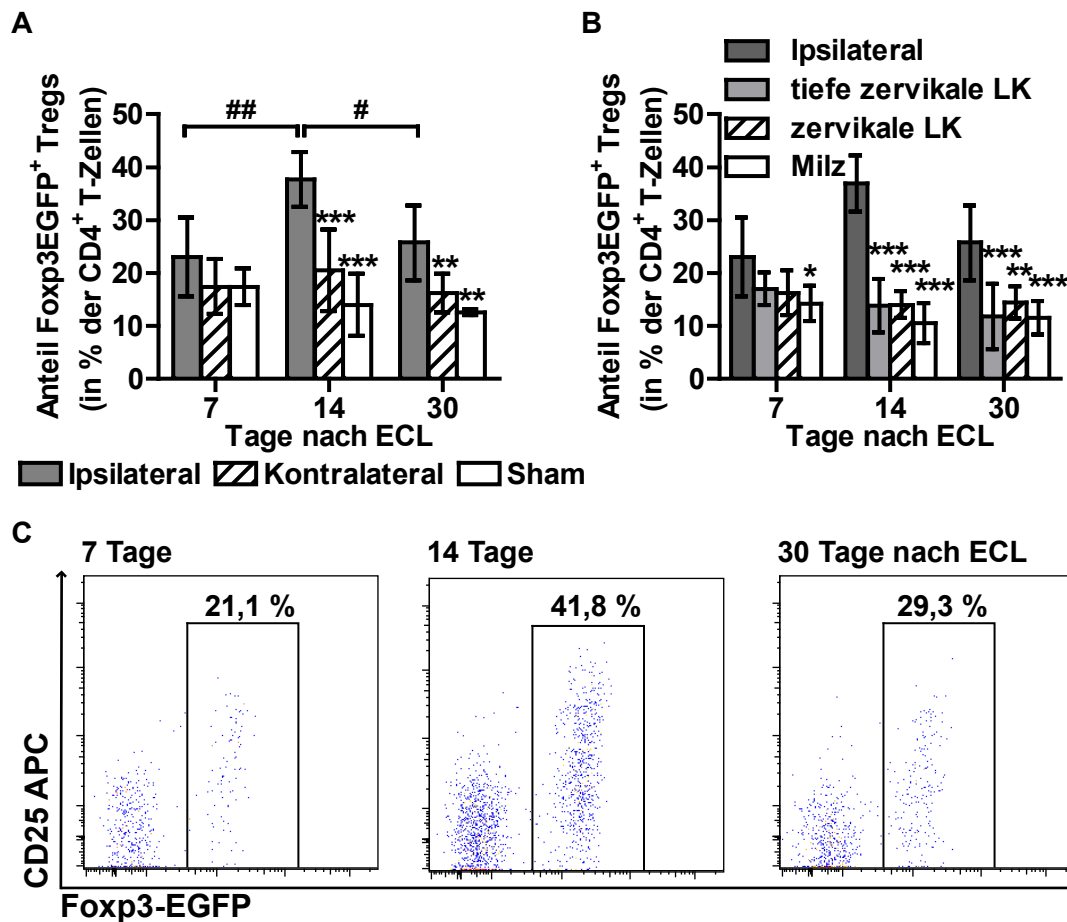


Abb. 14: Erhöhter Anteil Foxp3EGFP⁺ Tregs in % der CD4⁺ T-Zellen nach einer ECL. (A) und (B) 7, 14 und 30 Tage nach ECL wurde der prozentuale Anteil Foxp3EGFP⁺ Tregs im Gehirn und lymphatischen Organen bestimmt. Verglichen wurden ipsilaterale Hemisphären mit kontralateralen Hemisphären, Sham-Kontrolle und lymphatischen Organen (ANOVA mit Post Hoc Test Dunnett; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001) und ipsilaterale Hemisphären von den Tagen 7, 14 und 30 nach ECL (ANOVA mit Post Hoc Test Tukey; #P<0,05; ###P<0,01). Die prozentualen Anteile Foxp3EGFP⁺ Tregs der CD4⁺ Zellen sind als Mittelwerte ± SD dargestellt. Für ECL n = 6–7 pro Tag und für Sham-Kontrolle n = 3–5 pro Tag. (C) Repräsentative Dotplots der Analysen vom ipsilateralen Läsionsareal aus ECL behandelten Tieren. In den Dot Plots ist die CD4-Population dargestellt. Der Wert über dem Analysefenster gibt den Anteil Foxp3EGFP⁺ Tregs in % der CD4-Population der jeweiligen exemplarischen Probe wider.

3.2 Immunhistochemie im Gehirn nach ECL

Durchflusszytometrisch konnte eine starke Akkumulation der Foxp3EGFP⁺ Tregs im lädierten Gehirnareal nach ECL nachgewiesen werden. Im nächsten Schritt wurden die Tregs im Gehirn nach einer ECL immunhistochemisch lokalisiert. Zusätzlich wurde die Anwesenheit von Iba1⁺/MHCII⁺ Zellen im lädierten Gehirnareal überprüft. Ein Zellkontakt der Tregs mit antigenpräsentierenden Zellen könnte ein Hinweis für eine antigenspezifische Immunreaktion im Gehirn sein. Deshalb wurden Kryogewebeschnitte aus Gehirnen von Foxp3EGFP Reportermäusen 7, 14 und 30 Tage nach ECL angefertigt und mit Antikörper gegen Iba1, MHCII und EGFP markiert.

3.2.1 EGFP⁺ Tregs und Iba1⁺/MHCII⁺ Zellen akkumulieren im Läsionsareal

An den Tagen 7, 14 und 30 nach ECL waren EGFP⁺ Tregs im ipsilateralen Gewebe des Hippocampus und direkt an der Läsion detektierbar. Außerdem waren vermehrt Iba1⁺ Zellen und Iba1⁺/MHCII⁺ im ipsilateralen Hippocampus und an der Läsion zu sehen. Bei einzelnen EGFP⁺ Tregs konnte ein direkter Zellkontakt mit Iba1⁺/MHCII⁺ Zellen gesehen werden (Abb. 15A und Abb. 15B). In der kontralateralen Hemisphäre befanden sich im Bereich der entorhinalen Kortex und im Hippocampus Iba1⁺/MHCII⁺ residente Mikroglia, jedoch keine EGFP⁺ Tregs. (Abb. 15C).

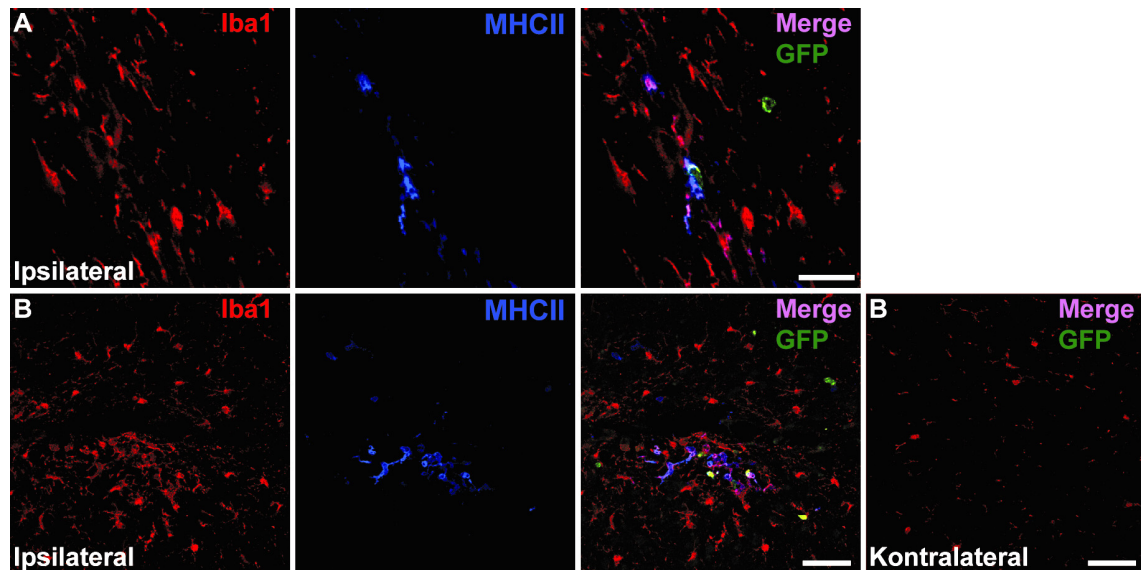


Abb. 15: Immunhistochemischer Nachweis EGFP⁺ Tregs und Iba1⁺/MHCII⁺ Zellen nach ECL im Gehirn. Konfokale Aufnahme des ipsilateralen Hippocampus (A) und der Läsion (B). Der Nachweis EGFP⁺ (grün), Iba1⁺ (rot) und MHCII⁺ (blau) Zellen ist hier beispielhaft an horizontalen Kryoschnitten aus Gehirnen 30 Tage (A) und 14 Tage (B) nach ECL dargestellt. Ipsilateral waren Iba1⁺/MHCII⁺ Zellen zu sehen. Zwischen EGFP⁺ Tregs und Iba1⁺/MHCII⁺ Zellen waren direkte Zellkontakte zu sehen. (C) Im Parenchym der kontralateralen Hemisphäre konnten keine EGFP⁺ und MHCII⁺ Zellen nachgewiesen werden. (A) Maßstabsbalken = 20 µm. (B) und (C) Maßstabsbalken = 50 µm.

3.3 Durchflusszytometrie der T-Zellen nach MCAO

Aufgrund der geringen Menge CD4⁺ T-Zellen und Foxp3EGFP⁺ Tregs die nach einer ECL im Läsionsareal detektiert werden konnte war in diesem Modell die weitere Durchführung der geplanten Analysen nicht möglich. Die Beobachtung, dass 14 und 30 Tage nach ECL eine starke Akkumulation Foxp3EGFP⁺ Tregs im lädierten Gehirnareal stattfindet sollte in einem weiteren Läsionsmodell verifiziert werden. Hierfür wurde in C57BL/6J Mäusen eine transiente MCAO durchgeführt, die zu einem ischämischen Infarkt führte (Abb. 5). Für die Charakterisierung der CD4⁺ T-Zellen wurde die gleiche Analysestrategie der Abb. 12 verwendet. Für die Markierung der Tregs wurde in diesem Fall ein Antikörper gegen Foxp3 verwendet (siehe Abb. 16A). Durch diese

Modifizierung konnte der Proliferationsmarker Ki-67 in das Färbeprotokoll mit aufgenommen werden.

3.3.1 CD4⁺ T-Zellen und Foxp3⁺ Tregs akkumulieren im Gehirn nach MCAO

Die absoluten Zellzahlen der CD4⁺ T-Zellen wurden in der ipsilateralen Hemisphäre an den Tagen 7, 14 und 30 nach MCAO bestimmt und untereinander, mit der kontralateralen Hemisphäre und der Hemisphäre aus der Sham-Kontrolle verglichen. In Abb. 16B sind die Mittelwerte \pm SD der CD4⁺ T-Zellen dargestellt. Bereits am Tag 7 nach MCAO war die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen in der ipsilateralen Hemisphäre (341 ± 184 Zellen) im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre (134 ± 72 Zellen) leicht erhöht. Im Vergleich zur Sham-Kontrolle war am Tag 7 kein Unterschied zu sehen. In der ipsilateralen Hemisphäre war am Tag 14 (4563 ± 3936 Zellen) und am Tag 30 (3854 ± 1628 Zellen) im Vergleich zu den jeweiligen kontralateralen Hemisphären (256 ± 127 und 285 ± 84 Zellen) und Sham-Kontrollen (184 ± 124 und 376 ± 164 Zellen) eine starke Akkumulation der CD4⁺ T-Zellen detektierbar. An den Tagen 14 und 30 war in der ipsilateralen Hemisphäre im Vergleich zu Tag 7 die Zunahme der CD4⁺ T-Zellen signifikant (Abb. 16A und Abb. 16B).

Als nächstes wurde der prozentuale Anteil Foxp3⁺ Tregs in der CD4-Population nach MCAO in ipsilateralen Hemisphären, peripheren lymphatischen Organen und Milz verglichen (Abb. 16C). Der prozentuale Anteil Foxp3⁺ Tregs war in der ipsilateralen Hemisphäre vom Tag 14 mit $31,7 \pm 6,7$ % und Tag 30 mit $34,8 \pm 8,3$ % im Vergleich zu Tag 7 mit $21,0 \pm 3,7$ % signifikant erhöht. Ebenfalls war der prozentuale Anteil Foxp3⁺ Tregs in der ipsilateralen Hemisphäre von den Tagen 14 und 30 im Vergleich zu zervikalen LK ($24,0 \pm 2,9$ % und $20,4 \pm 2,5$ %), inguinalen LK ($21,4 \pm 2,3$ % und $16,5 \pm 1,0$ %), Milz ($19,35 \pm 2,9$ % und $16,5 \pm 1,5$ %) und Blut ($14,4 \pm 2,4$ % und $11,3 \pm 1,6$ %) erhöht. Der prozentuale Anteil Foxp3⁺ Tregs war am Tag 7 in der ipsilateralen Hemisphäre im Vergleich zu zervikalen LK, inguinalen LK und Milz unverändert, jedoch im Vergleich zur Blutprobe leicht erhöht (Abb. 16A und Abb. 16C).

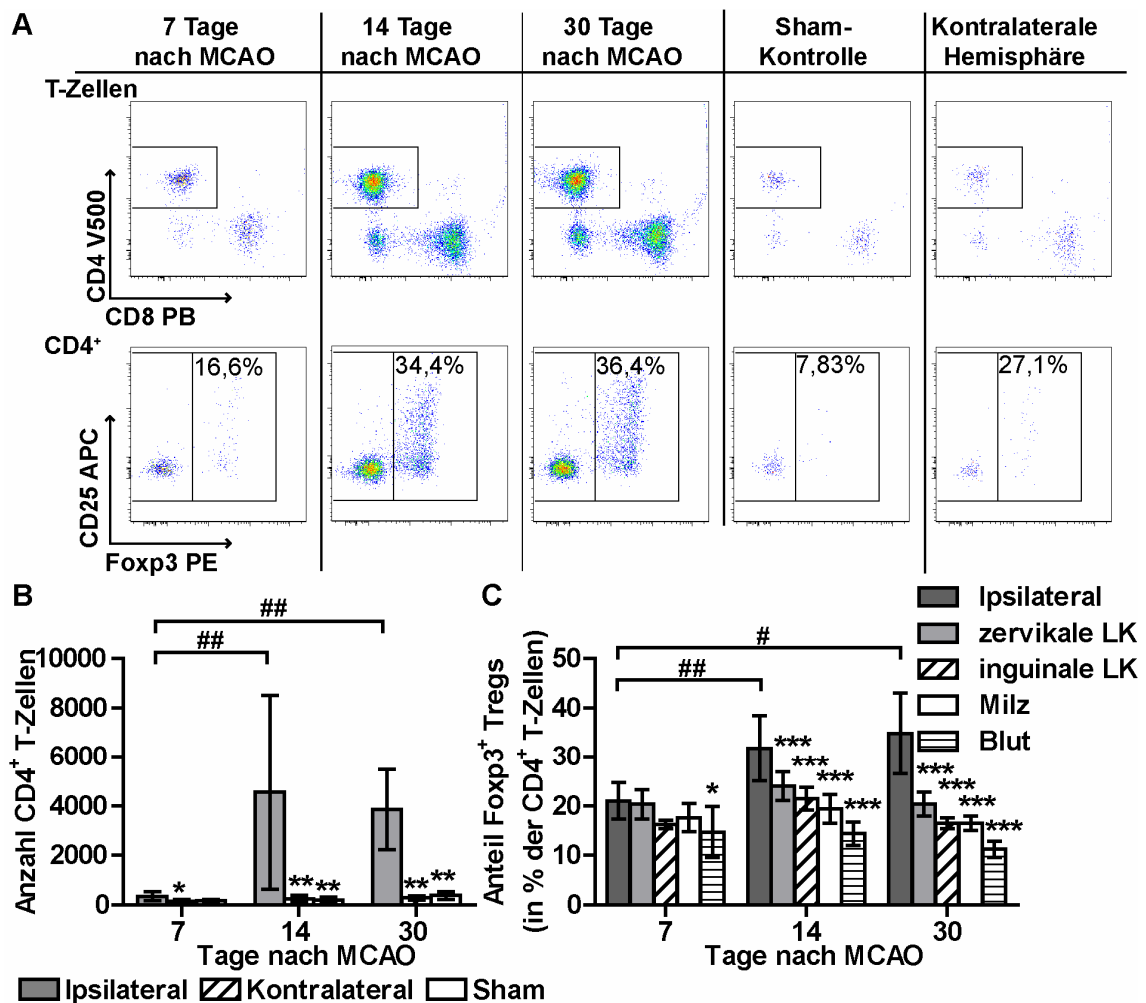


Abb. 16: Akkumulation CD4⁺ T-Zellen und Foxp3⁺ Tregs in der ischämischen Hemisphäre. 7, 14 und 30 Tage nach MCAO wurde die absolute Zellzahl der CD4⁺ T-Zellen und der prozentuale Anteil Foxp3⁺ Tregs im Gehirn und in lymphatischen Organen bestimmt. (A) Exemplarische Dotplots der ischämischen Hemisphären 7, 14 und 30 Tage nach MCAO und einer kontralateralen Hemisphäre und der Hemisphäre aus der Sham-Kontrolle. (B) Absolute Zellzahlen der CD4⁺ T-Zellen dargestellt als Mittelwerte \pm SD nach MCAO. Der Test zum Vergleich ipsilateraler Hemisphären mit kontralateralen Hemisphären und Sham war ANOVA und Post Hoc Test Dunett (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). Vergleich der ipsilateralen Hemisphären von den Tagen 7, 14 und 30 mit ANOVA (Games-Howell Post Hoc Test; ### $P < 0,01$). (C) Der Anteil Foxp3⁺ Tregs ist in % der CD4⁺ T-Zellen angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Zum Vergleich ipsilateraler Hemisphären mit lymphatischen Organen und Blut wurde ANOVA mit Post Hoc Test Dunett verwendet (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$). Vergleich der ipsilateralen Hemisphären von den Tagen 7, 14 und 30 mit ANOVA (Games-Howell Post Hoc Test; # $P < 0,01$; ## $P < 0,01$). Für die MCAO-Gruppe $n = 5-12$ pro Tag und für die Sham-Kontrolle $n = 4-8$ pro Tag.

Beim dem Vergleich der Peripherie nach MCAO mit der Sham-Kontrolle konnte am Tag 14 nach MCAO in den zervikalen LK, inguinalen LK und Milz eine signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils Foxp3⁺ Tregs mit $24,0 \pm 2,9 \%$, $21,4 \pm 2,3 \%$ und $19,35 \pm 2,9 \%$ im Vergleich zur Sham-Kontrolle mit $19,35 \pm 1,2 \%$, $17,0 \pm 1,3 \%$ und $16,7 \pm 2,1 \%$ beobachtet werden (Abb. 17A). Im Blut war kein Unterschied zu sehen.

Ergebnisse

An den Tagen 7 und 30 nach MCAO war in den peripheren lymphatischen Organen und dem Blut im Vergleich zur Sham-Kontrolle kein Unterschied zu sehen.

Im nächsten Schritt wurden die prozentualen Anteile der CD25⁺ Zellen in der Foxp3⁺ Tregs-Population im Gehirn und in der Peripherie untersucht (Abb. 17B–17D). Interessanterweise war ausschließlich am Tag 14 in der ischämischen Hemisphäre mit $50,6 \pm 6,0 \%$ der prozentuale Anteil der CD25⁺ Tregs im Vergleich zu Tag 7 ($63,9 \pm 8,0 \%$) und Tag 30 ($63,5 \pm 6,5 \%$) und im Vergleich zu den zervikalen LK ($63,7 \pm 5,0 \%$), inguinalen LK ($68,5 \pm 5,2 \%$) und Blut ($64,9 \pm 4,1 \%$) signifikant reduziert (Abb. 17C). An den Tagen 7 und 30 war kein Unterschied zwischen ischämischen Hemisphären und Peripherie im prozentualen Anteil CD25⁺ Tregs zu sehen. Ebenfalls blieb der prozentuale Anteil der CD25⁺ Tregs bezogen auf die Foxp3⁺ Tregs in den peripheren lymphatischen Organen und Blut 7, 14 und 30 Tage nach MCAO im Vergleich zur Sham-Kontrolle unverändert (Abb. 17D).

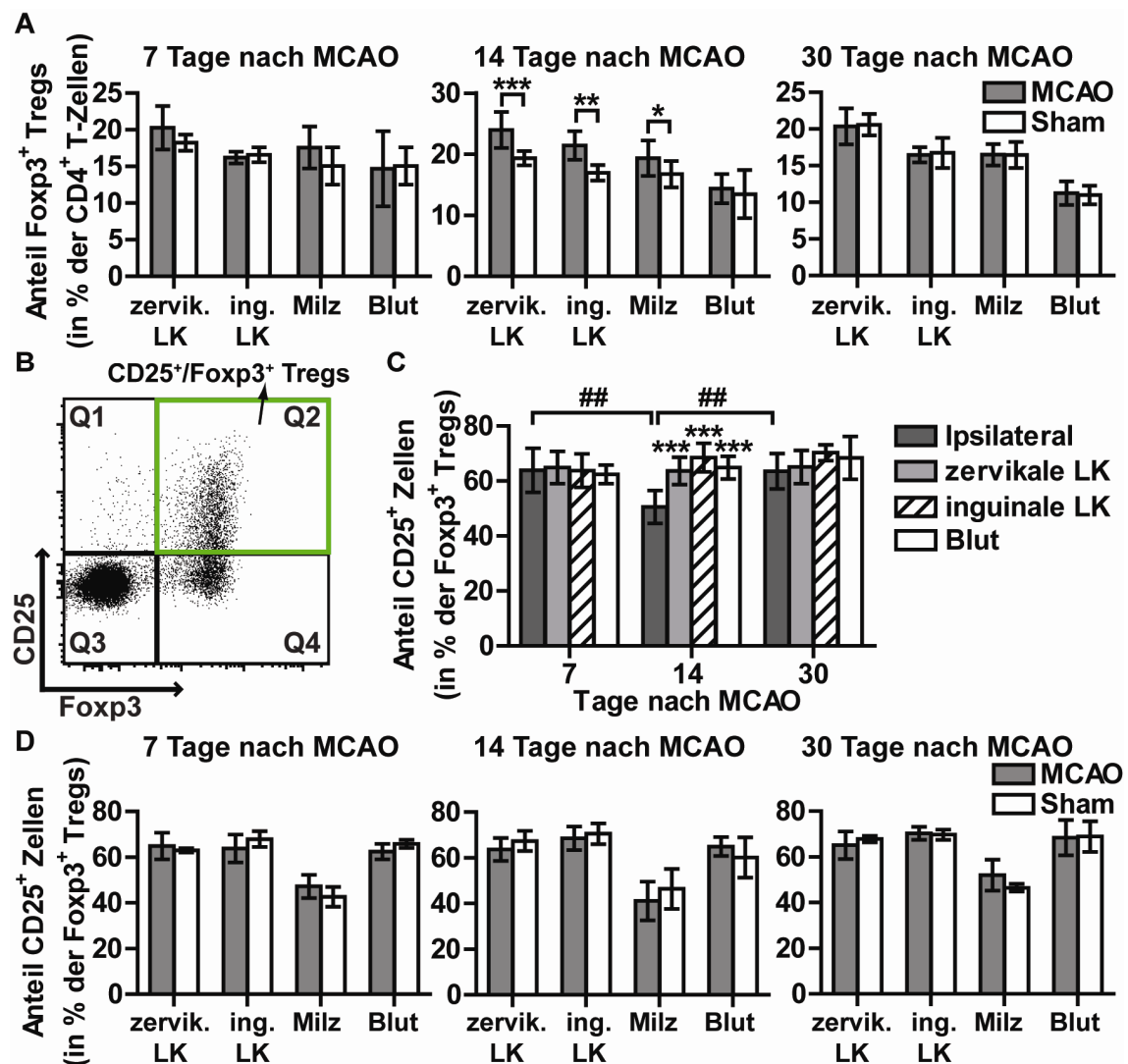


Abb. 17: Prozentualer Anteil Foxp3⁺ Tregs in den lymphatischen Organen und Blut und die Verteilung CD25⁺/Foxp3⁺ Tregs nach MCAO. (A) 7, 14 und 30 Tage nach MCAO wurde der prozentuale Anteil Foxp3⁺ Tregs in lymphatischen Organen bestimmt und mit der Sham-Kontrolle verglichen. (B) Exemplarische Darstellung CD4⁺

T-Zellen im Dotplot mit CD25 vs. Foxp3 aus ipsilateraler Hemisphäre 14 Tage nach MCAO. Der prozentuale Anteil Foxp3⁺/CD25⁺ Tregs (Q2) in der Foxp3⁺ Population (Q3+Q4) wurde 7, 14 und 30 Tage nach MCAO in den lymphatischen Organen bestimmt und mit den ipsilateralen Hemisphären (C) und der Sham-Kontrolle (D) verglichen. Mit dem Student t-Test wurden lymphatische Organe aus MCAO Mäusen mit der Sham-Kontrolle verglichen (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001). Vergleich ipsilateraler Hemisphären von den Tagen 7, 14 und 30 mit ANOVA (Post Hoc Test Tukey; ###P<0,01). Vergleich der ipsilateralen Hemisphären mit peripheren lymphatischen Organen mit ANOVA (Post Hoc Test Dunett; ***P<0,001). Es sind Mittelwerte ± SD dargestellt. Für MCAO-Gruppe n = 5–12 pro Tag und für Sham-Kontrolle n = 4–8 pro Tag.

3.3.2 Ein erhöhter Anteil CD4⁺ T-Zellen ist nach MCAO im Gehirn aktiviert

Die α -Kette des IL-2-Rezeptors CD25 wird auf CD4⁺ Effektor-T-Zellen in Abhängigkeit vom Aktivierungsstatus reguliert. Dementsprechend lässt sich im EAE-Modell und in unterschiedlichen Infektionsmodellen nach antigenspezifischer Aktivierung eine Hochregulierung von CD25 auf CD4⁺ Effektor-T-Zellen beobachten (Boyman and Sprent, 2012; Couper et al., 2009; Li et al., 2007; Taniguchi and Minami, 1993). Für den Nachweis aktivierter CD4⁺ T-Zellen nach einer MCAO wurde der prozentuale Anteil Foxp3⁺/CD25⁺ der CD4⁺/Foxp3⁻ Zellpopulation in lymphatischen Organen und im Gehirn bestimmt (Abb. 18A und Abb. 18B).

Am Tag 7 nach MCAO war in der ipsilateralen Hemisphäre mit $0,9 \pm 0,5$ % der Anteil aktivierter CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu den inguinalen LK ($0,3 \pm 0,1$ %) und Milz ($0,2 \pm 0,1$ %) signifikant erhöht. Beim Vergleich der ipsilateralen Hemisphäre mit den zervikalen LK wurde am Tag 7 kein Unterschied detektiert. In den ipsilateralen Hemisphären war am Tag 14 ($2,2 \pm 1,8$ %) und Tag 30 ($2,9 \pm 0,7$ %) der prozentuale Anteil aktivierter CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu den zervikalen LK ($0,9 \pm 0,2$ % und $1,0 \pm 0,3$ %), inguinalen LK ($0,9 \pm 0,2$ % und $0,8 \pm 0,2$ %) und Milz ($0,7 \pm 0,3$ % und $0,7 \pm 0,3$ %) erhöht. Am Tag 30 war in der ipsilateralen Hemisphäre der Anstieg aktivierter CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu Tag 7 signifikant (Abb. 18B).

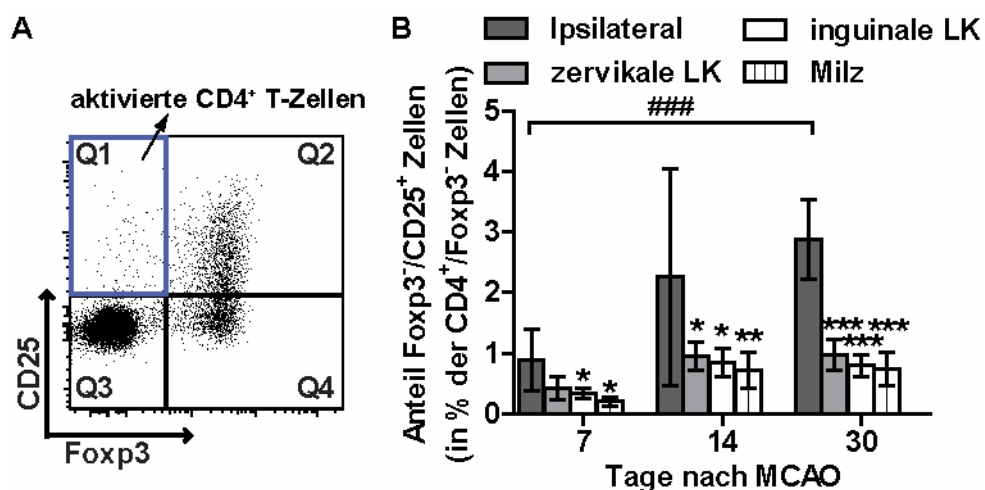


Abb. 18: Aktivierter CD4⁺ T-Zellen nach MCAO im Gehirn. 7, 14 und 30 Tage nach MCAO wurde der prozentuale Anteil aktivierter CD4⁺ T-Zellen in ipsilateralen

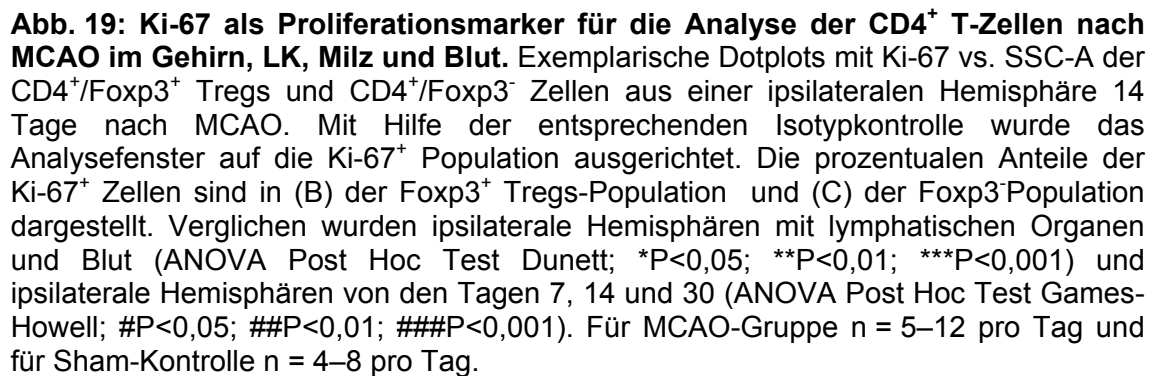
Hemisphären bestimmt und mit lymphatischen Organen verglichen. (A) Darstellung $CD4^+$ T-Zellen im Dotplot mit $CD25$ vs. $Foxp3$. Aktivierte $CD4^+$ T-Zellen waren $Foxp3^-$ und $CD25^+$ (Q1). Berechnet wurde der prozentuale Anteil $Foxp3^-/CD25^+$ Zellen (Q1) in der $Foxp3^-$ Population (Q1+Q3). (B) Zum Vergleich der lymphatischen Organe mit der ipsilateralen Hemisphäre wurde ANOVA mit Post Hoc Test Dunnett verwendet (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). Zum Vergleich der ipsilateralen Hemisphären vom Tag 7, 14 und 30 nach MCAO wurde ANOVA mit Post Hoc Test Games-Howell verwendet (### $P < 0,001$). Es sind Mittelwerte \pm SD dargestellt und $n = 5-12$ pro Tag.

3.3.3 Ein erhöhter Anteil $CD4^+$ T-Zellen ist positiv für Ki-67 nach Ischämie im Gehirn

Zur Markierung proliferierender $CD4^+$ T-Zellen und $Foxp3^+$ Tregs in der Durchflusszytometrie wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Ki-67 verwendet. Ki-67 ist ein Protein, welches ausschließlich in proliferierenden Zellen exprimiert wird und in allen aktiven Phasen des Zellzyklus vorhanden ist (Scholzen and Gerdes, 2000). Der prozentuale Anteil $Ki-67^+$ Zellen wurde in der $CD4^+/Foxp3^+$ Population und $CD4^+/Foxp3^-$ Population bestimmt (siehe Abb. 16A). Analysiert wurden ipsilaterale Hemisphären nach MCAO und zervikalen LK, inguinale LK, Blut und Milz nach MCAO und Sham-Eingriff. In Abb. 19A sind exemplarisch Dotplots der $CD4^+/Foxp3^+$ und $CD4^+/Foxp3^-$ Population aus einer ipsilateralen Hemisphäre 14 Tage nach MCAO mit anti-Ki-67 oder entsprechender Isotypkontrolle dargestellt. Die Mittelwerte \pm SD sind in Abb. 19B und Abb. 19C dargestellt.

Der prozentuale Anteil $Ki-67^+/Foxp3^+$ Tregs war in ipsilateralen Hemisphäre mit $63,0 \pm 6,4$ % am Tag 7 und $55,2 \pm 8,5$ % am Tag 14 im Vergleich zu zervikalen LK ($19,8 \pm 3,4$ % und $18,9 \pm 2,8$ %), inguinalen LK ($19,1 \pm 3,0$ % und $26,8 \pm 5,0$ %), Milz ($15,6 \pm 3,2$ % und $23,2 \pm 6,0$ %) und Blut ($20,1 \pm 4,1$ % und $24,3 \pm 5,8$ %) signifikant erhöht. Am Tag 30 war in der ipsilateralen Hemisphäre mit $23,0 \pm 4,9$ % der prozentuale Anteil $Ki67^+/Foxp3^+$ Tregs bereits signifikant niedriger als an den Tagen 7 und 14. Es war jedoch auch am Tag 30 der prozentuale Anteil $Ki-67^+/Foxp3^+$ Tregs im Vergleich zu zervikalen LK, inguinalen LK und Blut signifikant erhöht (Abb. 19A).

Bei der Analyse der $CD4^+/Foxp3^-$ Zellen im Gehirn war am Tag 7 mit $20,5 \pm 4,7$ %, Tag 14 mit $35,1 \pm 14,1$ % und Tag 30 mit $15,8 \pm 5,5$ % im Vergleich zu den zervikalen LK ($5,8 \pm 1,8$ %, $6,8 \pm 2,0$ % und $5,8 \pm 1,0$ %), inguinalen LK ($4,1 \pm 1,3$ %, $7,4 \pm 2,6$ % und $5,1 \pm 0,9$ %), Milz ($5,8 \pm 1,8$ %, $11,7 \pm 4,5$ % und $8,7 \pm 0,6$ %) und Blut ($7,1 \pm 2,3$ %, $15,6 \pm 10,7$ % und $8,1 \pm 2,1$ %) ein erhöhter Anteil positiv für Ki-67. Am Tag 14 war der prozentuale Anteil $Ki-67^+$ Zellen im Vergleich zu Tag 7 und Tag 30 am höchsten (Abb. 19B).



59

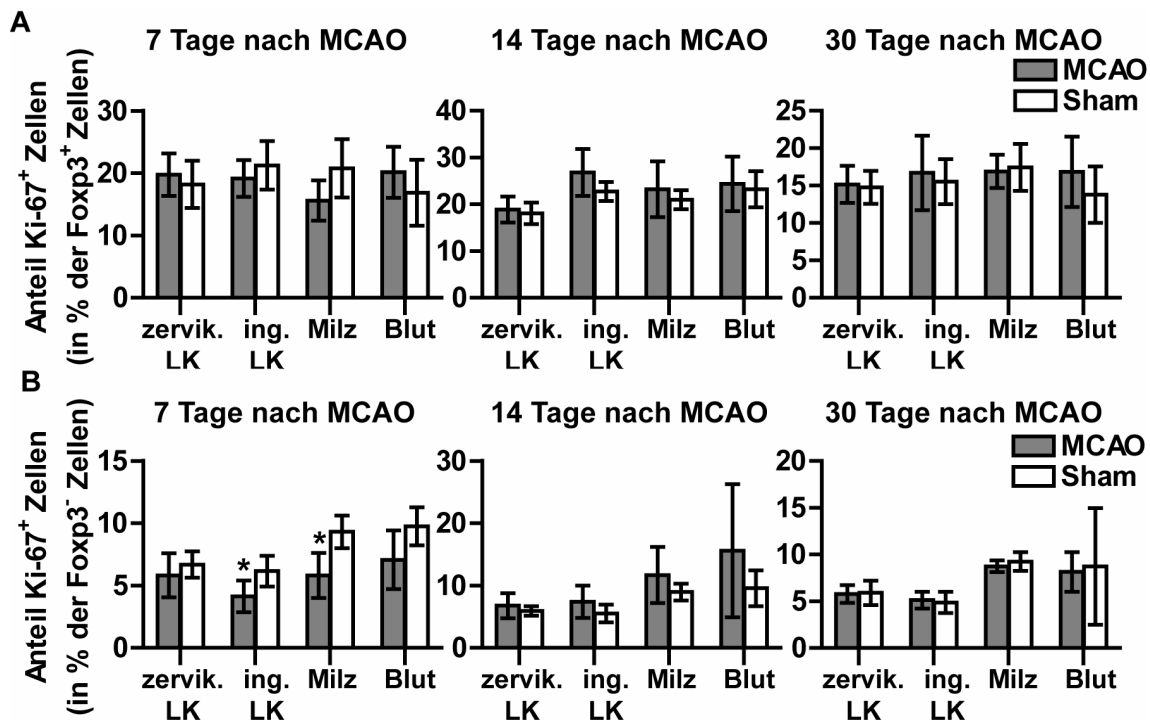


Abb. 20: Prozentualer Anteil Ki-67⁺ Zellen in zervikalen LK, inguinalen LK, Milz und Blut von Mäusen mit MCAO und Sham-Kontrolle. Ki-67⁺ Anteile der (A) Foxp3⁺ Tregs und (B) CD4⁺/Foxp3⁻ Zellen. Mittelwerte sind \pm SD dargestellt. Verglichen wurden die lymphatischen Organe und Blut aus MCAO behandelten Mäusen mit der jeweiligen Sham-Kontrolle (Student t-Test; *P<0,05). Für MCAO-Gruppe n = 5–12 pro Tag und für Sham-Kontrolle n = 4–8 pro Tag.

3.3.4 Die Anzahl CD4⁺ T-Zellen ist in inguinalen LK und Milz nach MCAO vermindert

In der hier vorliegenden Studie konnte eine relative Zunahme des prozentualen Anteils CD4⁺/Foxp3⁺ Tregs in zervikalen LK, inguinalen LK und Milz 14 Tage, jedoch nicht 7 und 30 Tage, nach MCAO beobachtet werden (Abb. 17A). Im nächsten Schritt wurde deswegen überprüft, ob am Tag 14 nach MCAO in peripheren lymphatischen Organen eine Veränderung in der absoluten Anzahl der CD4⁺ T-Zellen und Foxp3⁺ Tregs zu beobachten ist. Hierfür wurden zervikale LK, inguinale LK und Milz aus Foxp3EGFP Reportermäusen am Tag 14 nach MCAO und Sham-Kontrolle durchflusszytometrisch untersucht. In Abb. 21A und Abb. 21B sind die Zellzahlen als Mittelwerte \pm SD dargestellt.

In der Tat war in den inguinalen LK mit $5,21 \times 10^5 \pm 1,78 \times 10^5$ Zellen und Milz mit $6,04 \times 10^6 \pm 2,11 \times 10^6$ Zellen am Tag 14 nach MCAO die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zur Sham-Kontrolle mit $8,69 \times 10^5 \pm 3,00 \times 10^5$ Zellen und $8,67 \times 10^6 \pm 2,10 \times 10^6$ Zellen signifikant vermindert. In den zervikalen LK konnte jedoch nach MCAO ($8,01 \times 10^5 \pm 3,85 \times 10^5$ Zellen) kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Sham-Kontrolle ($1,13 \times 10^6 \pm 5,36 \times 10^5$ Zellen) beobachtet werden (Abb. 21A). Die Anzahl CD4⁺/Foxp3EGFP⁺ Tregs war in zervikalen LK, inguinalen LK und Milz unverändert (Abb. 21B).

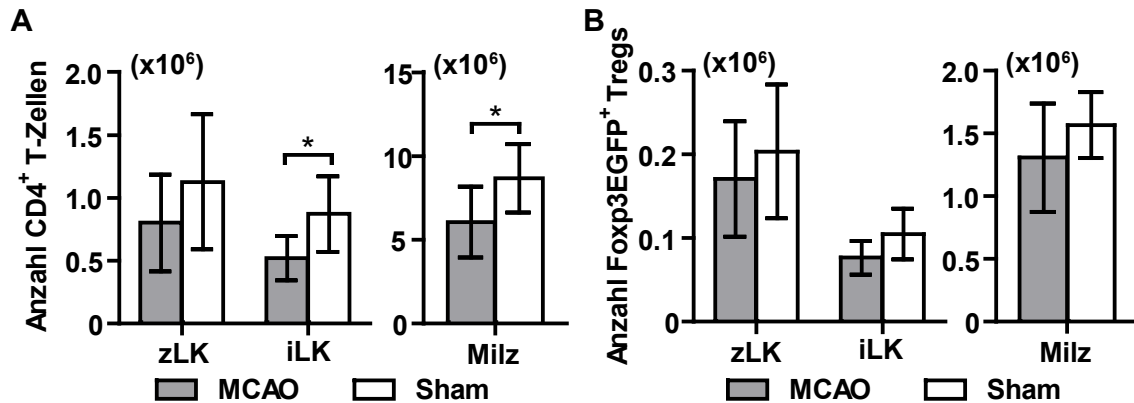


Abb. 21: Verminderte Anzahl CD4⁺ T-Zellen in inguinalen LK und Milz 14 Tage nach MCAO. 14 Tage nach MCAO wurde die absolute Zellzahl der CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺/Foxp3EGFP⁺ Tregs in zervikalen LK (zLK), inguinalen LK (iLK) und Milz bestimmt und mit der Sham-Kontrolle verglichen. (A) Absolute Zellzahlen der CD4⁺-Zellen nach MCAO. (B) Absolute Zellzahlen der CD4⁺/Foxp3EGFP⁺ Tregs nach MCAO. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. MCAO und Sham-Kontrolle wurden mit dem Student t-Test verglichen (* $P < 0,05$) mit jeweils $n = 7$ für MCAO und Sham-Kontrolle.

3.3.5 Verändertes TCR-V β -Repertoire auf CD4⁺ T-Zellen nach MCAO im Gehirn

In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob Unterschiede im TCR Repertoire der CD4⁺/FoxpEGFP⁻ Zellen und Foxp3EGFP⁺ Tregs im Gehirn im Vergleich zur Peripherie zu sehen sind. Hierfür wurden die variablen Segmente V β 8.1/8.2 und V β 11 der TCR β -Kette mit Antikörper angefärbt, um exemplarisch zwei Mitglieder der V β -Familie zu analysieren (Wilson et al., 1988). Die Analyse wurde an post-ischämischen Hemisphären, zervikalen LK, inguinalen LK und Milz aus Foxp3EGFP Reportermäusen am Tag 14 nach MCAO oder Sham-Eingriff durchgeführt. Bestimmt wurden die prozentualen Anteile der CD4⁺/FoxpEGFP⁻ Zellen und CD4⁺/Foxp3EGFP⁺ Tregs mit V β 8.1/8.2⁺ TCR und V β 11⁺ TCR (Abb. 22A–D).

In der ipsilateralen Hemisphäre war mit $9,3 \pm 3,4$ % im Vergleich zu zervikalen LK ($16,5 \pm 1,7$ %), inguinalen LK ($17,0 \pm 1,5$ %) und Milz ($19,4 \pm 0,5$ %) der Anteil CD4⁺/Foxp3EGFP⁻ Zellen mit einem V β 8.1/8.2⁺ TCR deutlich vermindert. Bei den CD4⁺/FoxpEGFP⁺ Tregs war in der ipsilateralen Hemisphäre mit $6,0 \pm 2,4$ % im Vergleich zu zervikalen LK ($10,3 \pm 3,0$ %), inguinalen LK ($11,9 \pm 2,6$ %) und Milz ($15,0 \pm 1,7$ %) der Anteil Zellen mit V β 8.1/8.2⁺ TCR ebenfalls signifikant vermindert. Bei dem Vergleich der lymphatischen Organe aus MCAO Mäusen mit lymphatischen Organen aus der Sham-Kontrolle konnte kein Unterschied in dem Anteil der V β 8.1/8.2⁺ TCR in der CD4⁺/Foxp3EGFP⁻ Population und CD4⁺/Foxp3EGFP⁺ Population beobachtet werden (Abb. 22A und Abb. 22B). Der Anteil CD4⁺/Foxp3EGFP⁻ Zellen mit einem V β 11⁺ TCR war in der ischämischen Hemisphäre mit $6,0 \pm 1,5$ % im Vergleich zu zervikalen LK ($4,3 \pm 0,7$ %), inguinalen LK ($3,9 \pm 0,9$ %) und Milz ($4,7 \pm 0,3$ %)

signifikant erhöht (Abb. 22C). In der $CD4^+/Foxp3EGFP^+$ Population war der Anteil mit einem $V\beta 11^+$ TCR in der ischämischen Hemisphäre im Vergleich zu den lymphatischen Organen unverändert. In den lymphatischen Organen war zwischen MCAO und Sham-Kontrolle kein Unterschied in den Anteilen der $CD4^+/Foxp3EGFP^-$ Zellen und $CD4^+/Foxp3EGFP^+$ Tregs mit $V\beta 11^+$ TCR zu erkennen (Abb. 22C und Abb. 22D).

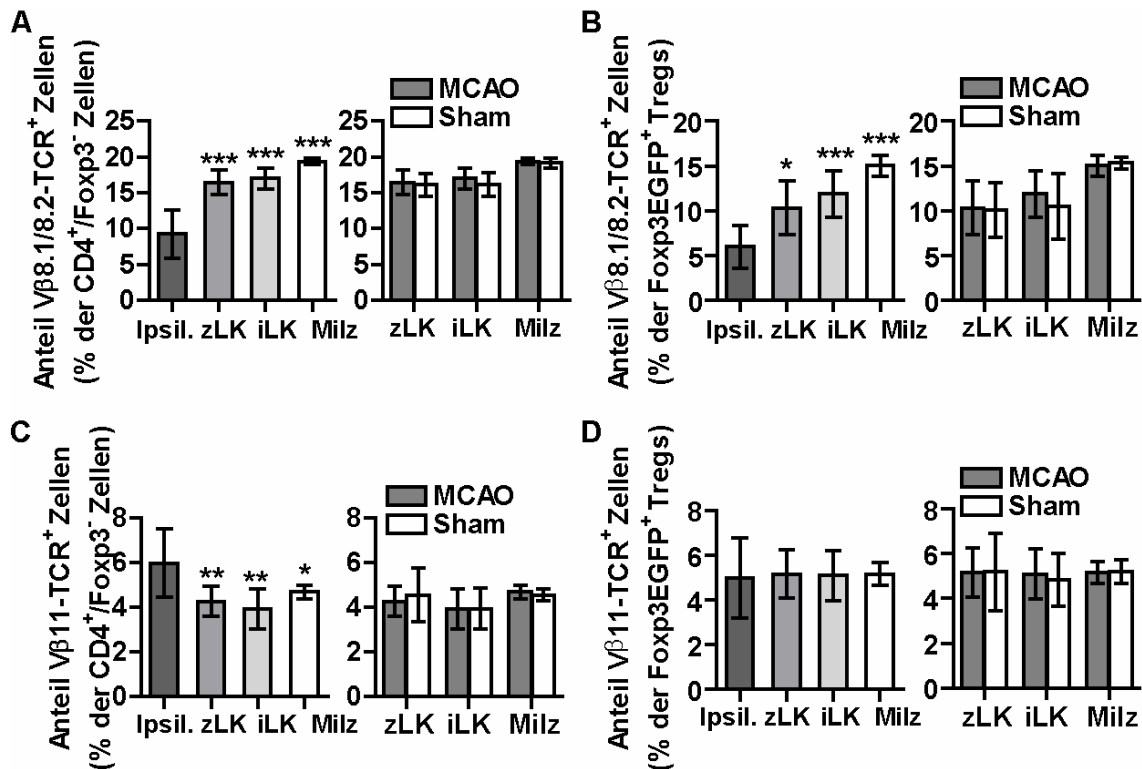


Abb. 22: Veränderte $V\beta$ -TCR auf $CD4^+/Foxp3EGFP^-$ Zellen und $CD4^+/Foxp3EGFP^+$ Tregs nach MCAO im Gehirn. Am Tag 14 nach MCAO wurden Zellen aus MCAO und Sham behandelten Mäusen durchflusszytometrisch analysiert. Verglichen wurden ipsilaterale Hemisphären (Ipsil.) mit zervikalen LK (zLK), inguinalen LK (iLK) und Milz und die lymphatischen Organe aus MCAO Mäusen mit der Sham-Kontrolle. (A) $V\beta 8.1/8.2^+$ TCR auf $CD4^+/Foxp3EGFP^-$ Zellen und (B) auf $Foxp3EGFP^+$ Tregs. (C) $V\beta 11^+$ TCR auf $CD4^+/Foxp3EGFP^-$ Zellen und (D) auf $Foxp3EGFP^+$ Tregs. Vergleich der ipsilateralen Hemisphären mit lymphatischen Organen durch ANOVA und post-hoc Test Dunett's (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$). MCAO Gruppen und Sham Kontrollen wurden mit dem Student t-Test verglichen. Pro Gruppe $n = 7$ und dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

3.4 Analyse der *de novo* Induktion von Tregs nach MCAO

An den Tagen 14 und 30 nach MCAO ist eine Anhäufung von Tregs im Infarktgebiet zu sehen (Abb. 16A–C). Zusätzlich war am Tag 14 nach MCAO ein erhöhter Anteil $Foxp3^+$ Tregs in den lymphatischen Organen zu sehen (Abb. 17A). Anhand eines bereits in der Literatur beschriebenen Modells des adoptiven Zelltransfers (Curotto de Lafaille et al., 2004) sollte untersucht werden, ob es zu einer *de novo* Induktion von Tregs aus naiven $CD4^+$ T-Zellen direkt im Gehirn oder in den lymphatischen Organen nach MCAO kommt. Für die Untersuchung einer möglichen *de novo* Induktion von Tregs wurden

naive CD4⁺ T-Zellen ohne Tregs aus Foxp3EGFP Mäusen einen Tag vor MCAO in RAG1^{-/-} Mäuse intravenös transferiert (Abb. 6).

3.4.1 Nach MCAO findet keine *de novo* Induktion von Tregs statt

Im ersten Versuchsansatz wurde für die Gewinnung der naiven CD4⁺ T-Zellen 2D2.Foxp3EGFP Mäuse verwendet (Abb. 6). Die T-Zellen aus dieser Maus tragen einen TCR spezifisch für MOG. MOG ist ein immundominantes Antigen in der C57BL/6J Maus und kann in diesem Stamm zur Einleitung einer aktiven EAE verwendet werden (Fazilleau et al., 2007).

Am Tag 14 nach MCAO konnten CD4⁺ T-Zellen in den lymphatischen Organen und im lädierten Gehirn detektiert werden. Sowohl in den mit MCAO behandelten Mäusen, als auch in der Sham-Kontrolle konnte ein geringer Anteil Foxp3EGFP⁺ Zellen in der CD4⁺ Population in zervikalen LK ($0,08 \pm 0,05 \%$ und $0,23 \pm 0,10 \%$), inguinalen LK ($0,14 \pm 0,04 \%$ und $0,20 \pm 0,12 \%$) und Milz ($0,38 \pm 0,18 \%$ und $0,20 \pm 0,09 \%$) beobachtet werden. Im Gehirn nach MCAO lag der Anteil Foxp3GFP⁺ Tregs ipsilateral bei $0,36 \pm 0,28 \%$ und kontralateral bei $0,63 \pm 0,44 \%$. In der Sham-Kontrolle war die Anzahl detektierter CD4⁺ T-Zellen im Gehirn für eine weitere Analyse zu gering. Der Anteil Foxp3GFP⁺ Tregs war jedoch nach MCAO beim Vergleich der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphäre mit lymphatischen Organen nicht erhöht. Zusätzlich war in den lymphatischen Organen zwischen Mäusen mit MCAO und Sham-Kontrolle kein Unterschied zu sehen (Abb. 23A).

Als nächstes wurden einen Tag vor MCAO naive CD4⁺ T-Zellen ohne Tregs aus Foxp3EGFP Reportermäusen mit einem Wildtyp T-Zell-Rezeptor Repertoire injiziert (Abb. 6). Am Tag 14 nach MCAO konnten die transferierten Zellen in den lymphatischen Organen detektiert werden. Zusätzlich fand eine starke Akkumulation von CD4⁺ T-Zellen im Gehirn statt. In diesem Versuch ließ sich ebenfalls nach MCAO und Sham-Eingriff ein geringer Anteil FoxpEGFP⁺ Tregs in zervikalen LK ($1,19 \pm 0,76 \%$ und $0,99 \pm 0,70 \%$), inguinalen LK ($2,02 \pm 1,18 \%$ und $1,48 \pm 0,62 \%$) und Milz ($0,79 \pm 0,39 \%$ und $0,73 \pm 0,25 \%$) beobachten (Abb. 23B). Im Gehirn lag nach MCAO und Sham-Eingriff der Anteil Foxp3EGFP⁺ Tregs ipsilateral bei $0,38 \pm 0,23 \%$ und $0,54 \pm 0,24 \%$ und kontralateral bei $0,54 \pm 0,24 \%$ und $0,59 \pm 0,22 \%$. Es ließ sich jedoch ebenfalls keine verstärkte Neubildung FoxpEGFP⁺ Tregs als Folge einer MCAO aus den zuvor injizierten naiven CD4⁺ T-Zellen im Gehirn und in den lymphatischen Organen beobachten (Abb. 23B).

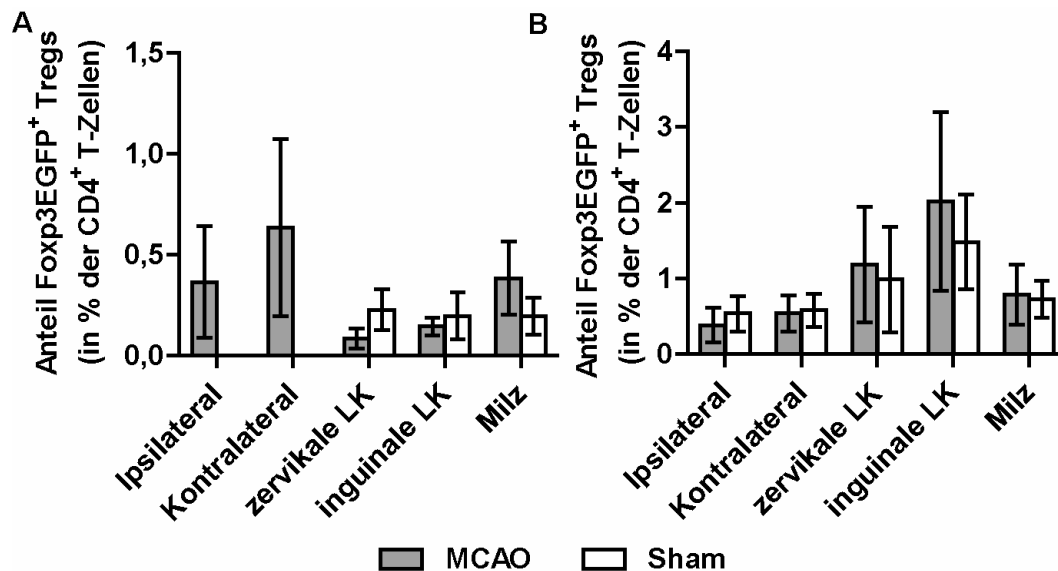


Abb. 23: Analyse der transferierten CD4⁺ T-Zellen auf FoxpEGFP⁺ Tregs 14 Tage nach MCAO. Anteil Foxp3EGFP⁺ Tregs nach dem Transfer von naiven CD4⁺ T-Zellen mit (A) einem TCR spezifisch gegen MOG oder (B) mit einem Wildtyp TCR Repertoire. Bei dem Vergleich der MCAO Mäuse und Sham-Kontrolle mit dem Student t-Test konnte keine signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils Foxp3EGFP⁺ Tregs detektiert werden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. In (A) n = 7 für MCAO Gruppe und n=5 für Sham-Kontrolle. In (B) n = 4 für MCAO Gruppe und n = 3 für Sham-Kontrolle.

3.5 Immunhistochemie der CD4⁺/Foxp3EGFP⁺ Tregs nach MCAO

Mit der durchflusszytometrischen Analyse der ischämischen Hemisphären konnte eine starke Akkumulation von CD4⁺ T-Zellen und Foxp3EGFP⁺ Tregs an den Tagen 14 und 30 im Gehirn nachgewiesen werden. Im nächsten Schritt wurden Gehirnschnitte aus Foxp3EGFP Reportermäusen nach MCAO immunhistochemisch angefärbt, um die CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺/Foxp3EGFP⁺ Tregs im Gehirn zu lokalisieren. Zum immunhistochemischen Nachweis wurden frontale Kryogewebeschnitte mit 12 μ m dicke von Gehirnen aus Foxp3EGFP Reportermäusen 7, 14 und 30 Tage nach MCAO angefertigt. CD4 und EGFP wurden mit Antikörper markiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI markiert. Für Gehirnschnitte aus Tieren 14 Tage nach MCAO wurde ein Antikörper gegen Laminin für die Färbung der Basallamina in der Gehirnvaskulatur verwendet. Insbesondere sollte ermittelt werden, ob die Immunzellen direkt im Infarktgebiet lokalisiert sind, oder primär in dem angrenzenden Peri-Infarktgebiet.

3.5.1 CD4⁺ Zellen und Foxp3EGFP⁺ Tregs wandern ins Infarktgebiet ein

An den Tagen 14 und 30 nach MCAO lässt sich das Infarktgebiet von dem Peri-Infarktgebiet anhand eines Verlusts der morphologischen Integrität und einem stark granulären Erscheinungsbild unterscheiden (Abb. 24A). Durch die Anfärbung der Basallamina konnten am Tag 14 nach MCAO CD4⁺ Zellen und CD4⁺/Foxp3EGFP⁺ Tregs im Parenchym des Peri-Infarktgebiets nachgewiesen werden (Abb. 24B). Am

Tag 7 nach MCAO waren vereinzelt $CD4^+$ Zellen und $CD4^+/Foxp3EGFP^+$ Tregs im Infarktgebiet und Peri-Infarktgebiet zu sehen. An den Tagen 14 und 30 nach MCAO konnte eine massive Akkumulation $CD4^+$ Zellen und $CD4^+/Foxp3EGFP^+$ Tregs im Infarktgebiet detektiert werden (Abb. 24C). In kontralateral Hemisphären konnten keine $CD4^+$ Zellen und $CD4^+/Foxp3EGFP^+$ Tregs im Parenchym beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

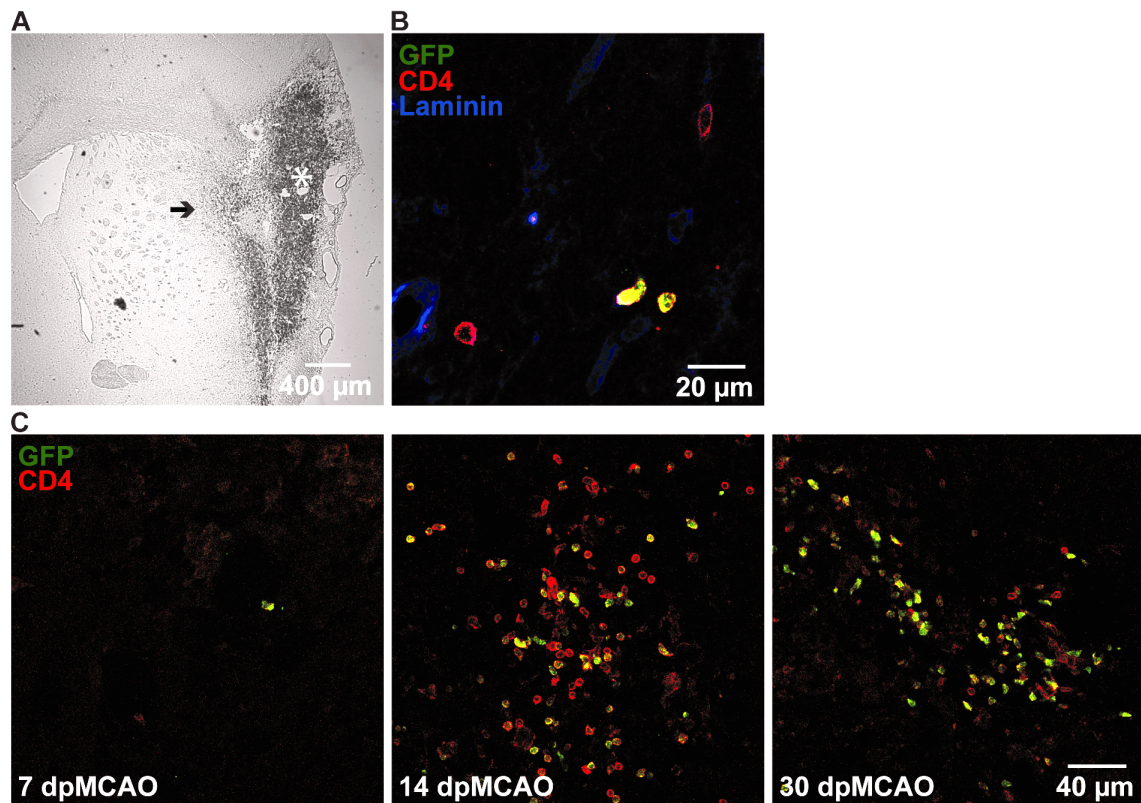


Abb. 24: Immunhistochemischer Nachweis der $CD4^+$ Zellen und $CD4^+/Foxp3EGFP^+$ Tregs nach MCAO im Gehirn von Foxp3EGFP Reportermäusen. (A) Mikroskopische Weißlichtaufnahme eines Ausschnitts der ischämischen Hemisphäre 14 Tage nach MCAO. Das Peri-Infarktgebiet (Pfeil) ist morphologisch intakt. Das Infarktgebiet (Stern) ist anhand des Verlustes der morphologischen Integrität und des granulären Erscheinungsbildes erkennbar. (B) Konfokale Aufnahme des Peri-Infarktgebiets 14 Tage nach MCAO (dpMCAO). Laminin-positive Blutgefäße sind blau dargestellt. $CD4^+$ (rot) und $EGFP^+$ (grün) Zellen sind aus den Blutgefäßen ins Parenchym migriert. (C) Konfokale Aufnahmen der Infarktgebiete 7, 14 und 30 Tage nach MCAO (dpMCAO). An den Tagen 14 und 30 nach MCAO fand eine starke Akkumulation von $CD4^+$ Zellen und $CD4^+/EGFP^+$ Tregs im Infarktgebiet statt.

3.5.2 Foxp3EGFP⁺ Tregs proliferieren nach MCAO im Gehirn

Durch die Analyse der post-ischämischen Hemisphären am Durchflusszytometer konnte mit dem Proliferationsmarker Ki67 eine erhöhte Proliferation der Foxp3⁺ Tregs festgestellt werden. Durch die Anfärbung der Zellkerne mit DAPI in koronalen Kryogewebeschnitten waren im Infarktgebiet Foxp3EGFP⁺ Tregs zu sehen, welche

sich in der Zellteilung befanden (Abb. 25). Diese Beobachtungen bestätigen die Annahme, dass Foxp3^+ Tregs im Gehirn nach MCAO proliferieren.

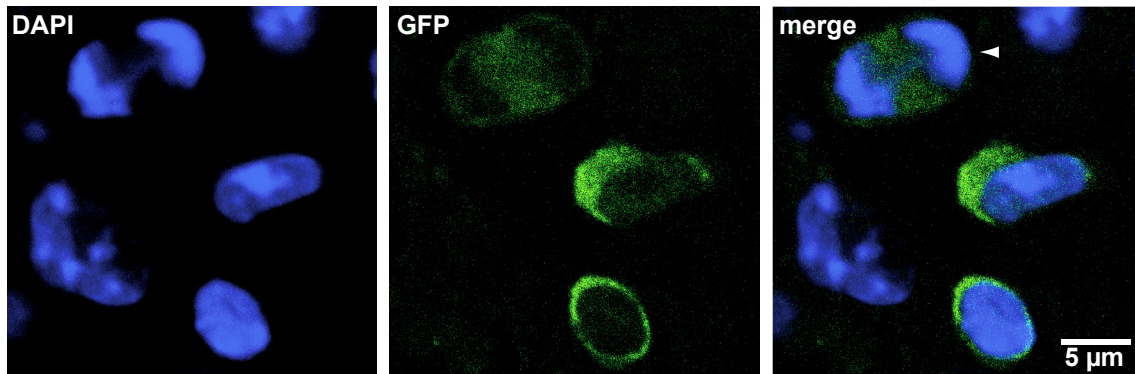


Abb. 25: Foxp3EGFP^+ Tregs während der Zellteilung (Pfeilspitze) im Infarktgebiet. Exemplarisch wird hier eine konfokale Aufnahme des Infarktgebiets von Gehirnschnitten aus Foxp3EGFP Reportermäusen 14 Tage nach MCAO dargestellt. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) und Tregs mit Antikörper gegen EGFP (grün) markiert.

3.6 Durchflusszytometrie der Makrophagen, dendritischen Zellen und Mikroglia im Gehirn nach MCAO

In diesem Versuchsabschnitt sollte geklärt werden, ob 7, 14 und 30 Tage nach MCAO antigenpräsentierende Zellen im Gehirn akkumulieren. Antigenpräsentierende Zellen sind wichtig für die Präsentation von Antigenen an T-Zellen und deren antigenspezifische Stimulation. Möglicherweise lässt sich eine zeitliche Korrelation der Akkumulation von T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen in ipsilateralen Hemisphären beobachten.

Aus diesem Grund wurden Makrophagen, dendritische Zellen und Mikroglia in ipsilateralen und kontralateralen Gehirnhemisphären aus C57BL/6J Mäusen 7, 14 und 30 Tage nach MCAO mit dem Durchflusszytometer untersucht. CD45 lässt sich in der Durchflusszytometrie als Marker zur Charakterisierung von Mikroglia, Makrophagen und dendritischen Zellen nach einer MCAO (Campanella et al., 2002; Felger et al., 2010; Gelderblom et al., 2009) und Läsion im Gehirn (Babcock et al., 2003) einsetzen. Im ersten Dotplot wurde CD45 gegen SSC-A dargestellt. Damit ließen sich die Mikroglia, welche CD45 schwach ($=\text{CD45}^{\text{dim}}$) exprimieren von den CD45 stark ($=\text{CD45}^{\text{high}}$) exprimierenden dendritischen Zellen und Makrophagen unterscheiden. Letztere sind granulärer als Lymphozyten, welche ebenfalls mit $\text{CD45}^{\text{high}}$ identifizierbar sind, und lassen sich deshalb von diesen durch den SSC-A im ersten Dotplot unterscheiden. In der CD45^{dim} Population wurden anschließend Mikroglia über den Marker CD11b identifiziert. Die dendritischen Zellen der $\text{CD45}^{\text{high}}$ Population sind mit Hilfe der Marker CD11b und CD11c identifizierbar. Die Makrophagen hingegen sind CD11c^- und CD11b^+ (Abb. 26). Mit einer sog. *Backgate*-Analyse und einer Projektion

des CD11b in den ersten CD45 vs. SSC-A Dotplot lässt sich das Analysefenster für die CD45^{high} Makrophagen und DCs genau ausrichten. Ipsilesional war eine leichte Verschiebung der CD45^{dim} Population im CD45 vs. SSC-A Dotplot zu beobachten. Die CD45^{dim} Population war jedoch durchweg als distinkte Population identifizierbar (Abb. 27). Mikroglia, dendritische Zellen und Makrophagen wurden zusätzlich hinsichtlich der Expression des MHCII untersucht (Abb. 26). Mikroglia exprimieren im ruhenden Zustand kein MHCII, können jedoch nach Aktivierung MHCII⁺ werden (Aloisi et al., 2000).

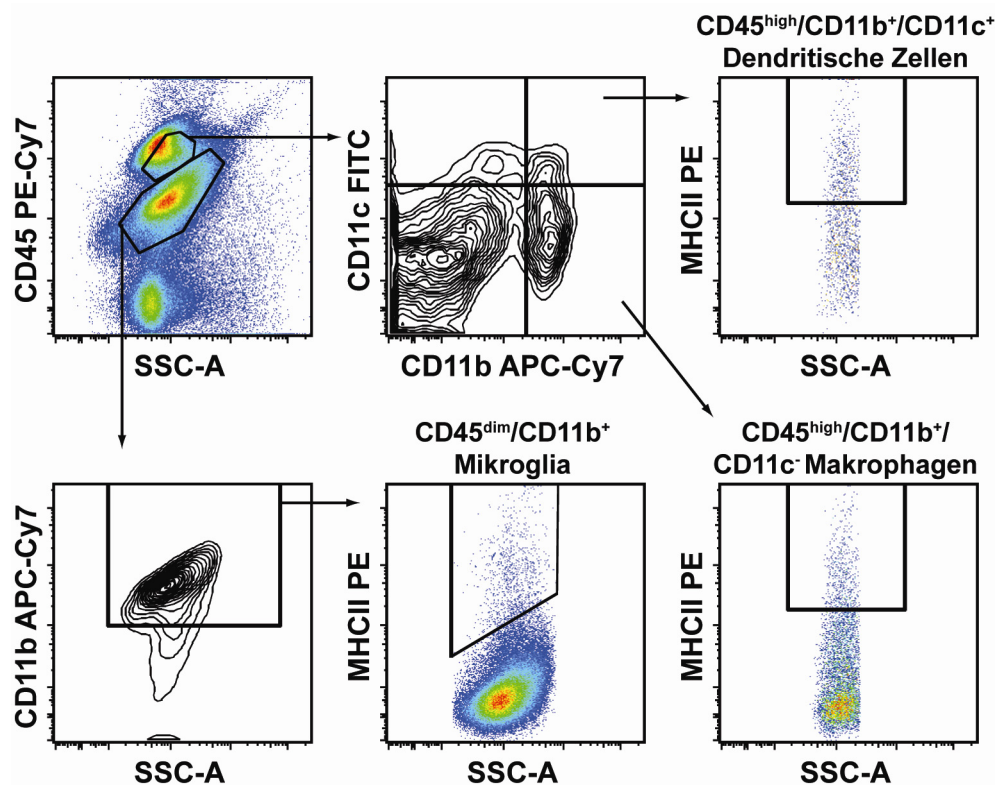


Abb. 26: Analyse der Mikroglia, dendritischen Zellen und Makrophagen mit dem Durchflusszytometer nach MCAO. Darstellung der Strategie zum setzen der Analysefenster anhand einer Probe aus der ipsilateralen Hemisphäre 14 Tage nach MCAO. CD45^{dim}/CD11b⁺ Zellen wurden als Mikroglia charakterisiert. CD45^{high}/CD11b⁺/CD11c⁻ wurden als Makrophagen und CD45^{high}/CD11b⁺/CD11c⁺ als dendritische Zellen charakterisiert. Der Anteil MHCII⁺ Zellen wurde anschließend in diesen drei Zelltypen bestimmt.

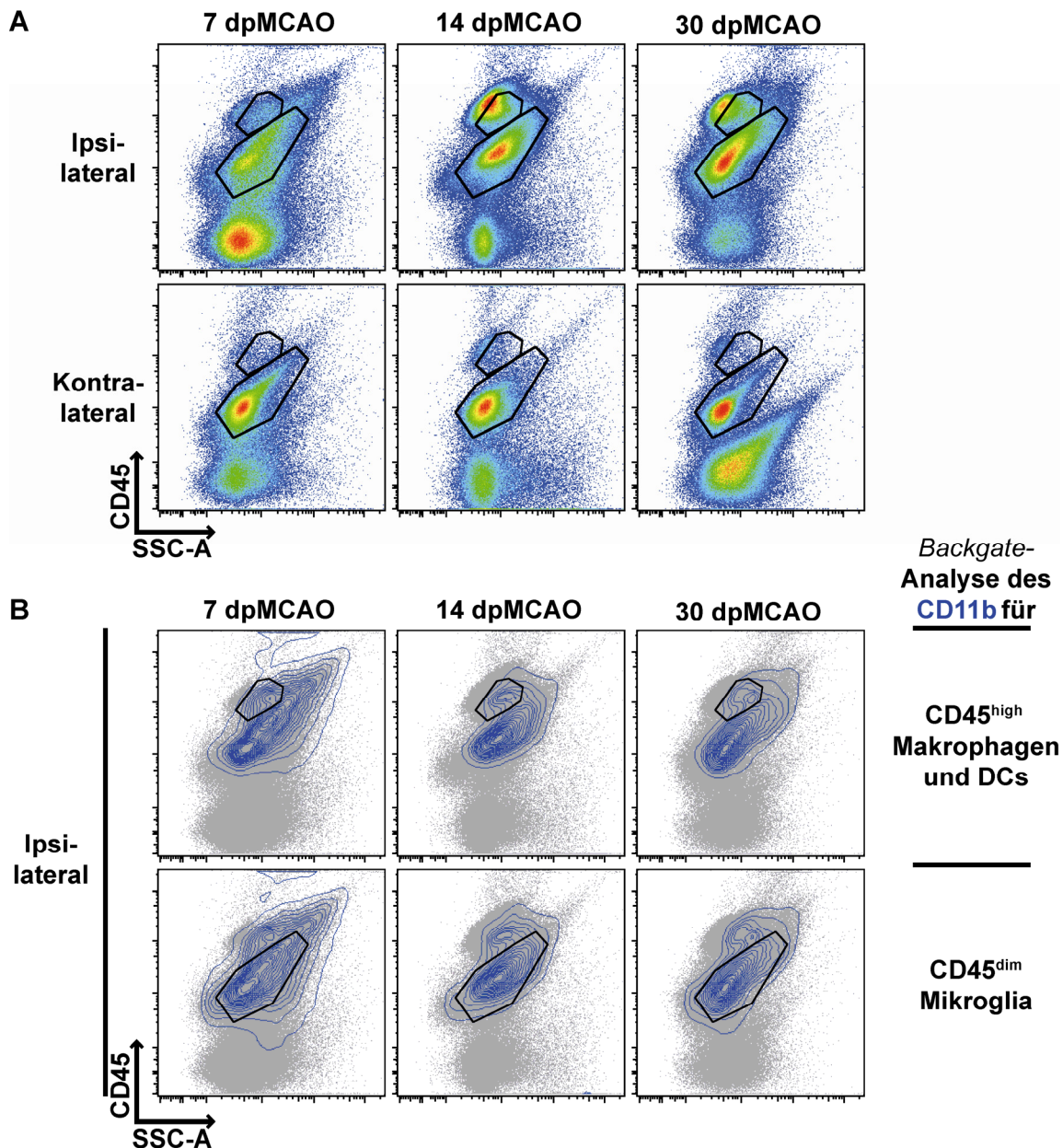


Abb. 27: Repräsentative Dotplots von isolierten Zellen aus dem Gehirn 7, 14 und 30 Tage nach MCAO. (A) Ipsilateral ist im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre eine leicht Verschiebung der CD45^{dim} Population im CD45 vs. SSC-A Dotplot zu sehen. Über den SSC-A lassen sich die Lymphozyten von den granuläreren CD45^{high} Makrophagen und dendritischen Zellen unterscheiden. (B) Die CD11b⁺ Zellpopulation (blauer Konturenplot) wurde mit einer *Backgate*-Analyse in das erste CD45 vs. SSC-A Dotplot projiziert. Damit ließ sich das Analysefenster im CD45 vs. SSC-A Dotplot sehr genau auf die CD45^{high} Makrophagen und dendritischen Zellen ausrichten. Gezeigt werden ipsilaterale Hemisphären der Proben vom Bild (A).

3.6.1 Mikroglia akkumulieren in der ischämischen Hemisphäre und werden nach MCAO aktiviert

Zunächst wurde die absolute Zellzahl der CD45^{dim}/CD11b⁺ Mikroglia und der Anteil MHCII⁺ Mikroglia in der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphäre bestimmt und die Mittelwerte \pm SD verglichen (Abb. 28A–C). Am Tag 7 nach MCAO wurde in der ischämischen Hemisphäre mit 44777 ± 6938 Mikroglia im Vergleich zur kontralateralen

Hemisphäre mit 46687 ± 21999 Mikroglia kein Unterschied beobachtet. Ipsilateral war am Tag 14 (80652 ± 12743 Mikroglia) und Tag 30 (96604 ± 29405 Mikroglia) nach MCAO ein starke Zunahme in der Anzahl Mikroglia im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre (44573 ± 12246 und 38262 ± 4949 Mikroglia) und der ipsilateralen Hemisphäre von Tag 7 zu erkennen (Abb. 28A). Ebenfalls stieg die Anzahl der MHCII⁺ Mikroglia am Tag 14 (544 ± 357 Mikroglia) und Tag 30 (1321 ± 867 Mikroglia) nach MCAO im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre (96 ± 57 und 129 ± 27 Mikroglia) signifikant an (Abb. 28B). Hinsichtlich des prozentualen Anteils der MHCII⁺ Mikroglia war am Tag 14 und Tag 30 eine signifikante Erhöhung in der ischämischen Hemisphäre ($0,64 \pm 0,32$ % und $1,29 \pm 0,57$ %) im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre ($0,20 \pm 0,06$ % und $0,34 \pm 0,07$ %) zu sehen (Abb. 28C).

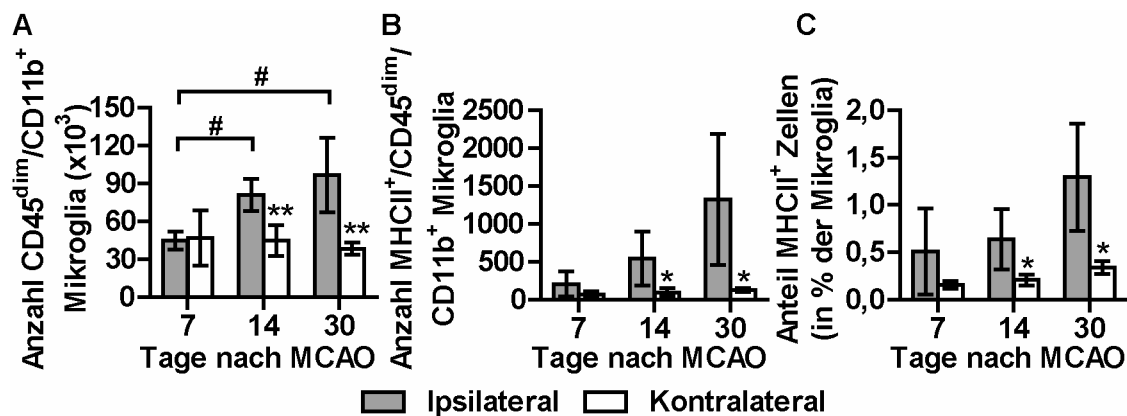


Abb. 28: Akkumulation der Mikroglia und MHCII⁺ Mikroglia in der ischämischen Hemisphäre. 7, 14 und 30 Tage nach MCAO wurde die Anzahl der (A) CD45^{dim}/CD11b⁺ Mikroglia und (B) aktivierten MHCII⁺/CD45^{dim}/CD11b⁺ Mikroglia in der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphäre bestimmt. (C) Zusätzlich wurde zu diesen Zeitpunkten der prozentuale Anteil der MHCII exprimierenden Mikroglia berechnet. Verglichen wurden ipsilaterale Hemisphären mit kontralateralen Hemisphären mit dem Student t-Test (*P<0,05; **P<0,01). Vergleich der ipsilateralen Hemisphären von den Tagen 7, 14 und 30 mit ANOVA (Games-Howell Post Hoc Test; #P<0,05). Dargestellt sind Mittelwerte ± SD mit n = 3–5.

3.6.2 Dendritische Zellen und Makrophagen infiltrieren in das ischämische Gehirn

Die Mittelwerte ± SD der Anzahl dendritischer Zellen waren ipsilateral an den Tagen 7 (1927 ± 676 Zellen), 14 (1125 ± 384 Zellen) und 30 (1385 ± 770 Zellen) nach MCAO im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre (70 ± 52 , 100 ± 94 und 34 ± 11 Zellen) signifikant erhöht (Abb. 29A). Die Anzahl der MHCII⁺ dendritischen Zellen war in der ischämischen Hemisphäre am Tag 14 (277 ± 159 Zellen) und Tag 30 (176 ± 104 Zellen) signifikant höher als in den kontralateralen Hemisphären ($39 \pm 43,94$ und 15 ± 7 Zellen; Abb. 29B). Zusätzlich ließ sich in der ipsilateralen Hemisphäre eine höhere Anzahl MHCII⁺ dendritischer Zellen am Tag 7 (437 ± 201 Zellen) im Vergleich zu Tag 30 (176 ± 104 Zellen) beobachten. Die Anzahl

der Makrophagen war ipsilateral am Tag 14 mit 7162 ± 2029 Zellen und Tag 30 mit 7703 ± 3899 Zellen im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre (247 ± 110 und 366 ± 137 Zellen) signifikant erhöht (Abb. 29C). In der ischämischen Hemisphäre war an den Tagen 7 (121 ± 14 Zellen), 14 (328 ± 184 Zellen) und 30 (286 ± 177 Zellen) eine erhöhte Anzahl MHCII⁺ Makrophagen im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre (20 ± 9 , 20 ± 17 und 15 ± 8 Zellen) zu sehen (Abb. 29D).

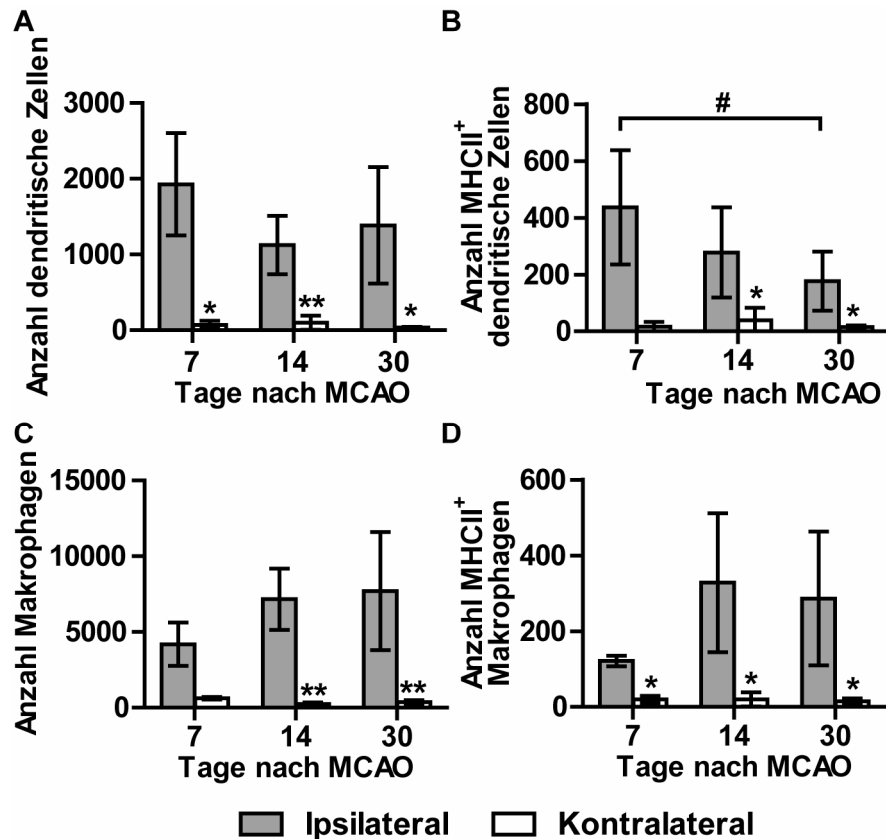


Abb. 29: Akkumulation der Makrophagen und dendritischen Zellen in der ischämischen Hemisphäre. 7, 14 und 30 Tage nach MCAO wurde die Anzahl der (A) dendritischen Zellen, (B) MHCII⁺ dendritischen Zellen, (C) Makrophagen und (D) MHCII⁺ Makrophagen bestimmt. Vergleich ipsilateraler Hemisphären mit kontralateralen Hemisphären mit dem Student t-Test (*P<0,05; **P<0,01) und ipsilateraler Hemisphären vom Tag 7, 14 und 30 mit ANOVA (Games-Howell Post Hoc Test; #P<0,05). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD mit n = 3–5.

3.7 Immunhistochemie antigenpräsentierender Zellen nach MCAO

Das Ziel des nächsten Versuches war die zuvor mit dem Durchflusszytometer quantifizierten antigenpräsentierenden Zellen im Gehirn nach einer MCAO zu lokalisieren. Durch die immunhistochemische Untersuchung sollte zusätzlich überprüft werden, ob ein Zellkontakt zwischen den Foxp3EGFP⁺ Tregs und MHCII⁺ antigenpräsentierenden Zellen besteht.

Die dendritischen Zellen wurden mit einem Antikörper gegen CD11c markiert. In der Immunhistochemie gibt es momentan keinen spezifischen Marker zur Unterscheidung zwischen Makrophagen und Mikroglia, deswegen wurde ein Antikörper gegen Iba1 verwendet, um Zellen mit monozytärer Herkunft zu markieren, wie Mikroglia, Makrophagen und myeloide dendritischen Zelle (Ito et al., 2001). Zusätzlich zu CD11c oder Iba1 wurde ein Antikörper gegen MHCII verwendet. Für die immunhistochemischen Versuche wurden Foxp3EGFP Reportermäuse verwendet.

3.7.1 Zellkontakt antigenpräsentierender Zellen mit Tregs im Infarktgebiet

Die $CD11c^+$ und $CD11c^+/MHCII^+$ dendritischen Zellen konnten an den Tagen 7, 14 und 30 nach MCAO in lokalen Anhäufungen in der ischämischen Hemisphäre detektiert werden (Abb. 30A). Kontralateral konnten keine $CD11c^+$ oder $MHCII^+$ im Hirnparenchym beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Es ließen sich ipsilateral Zellkontakte $Foxp3EGFP^+$ Tregs mit $MHCII^+$ dendritischen Zellen nachweisen (Abb. 30B).

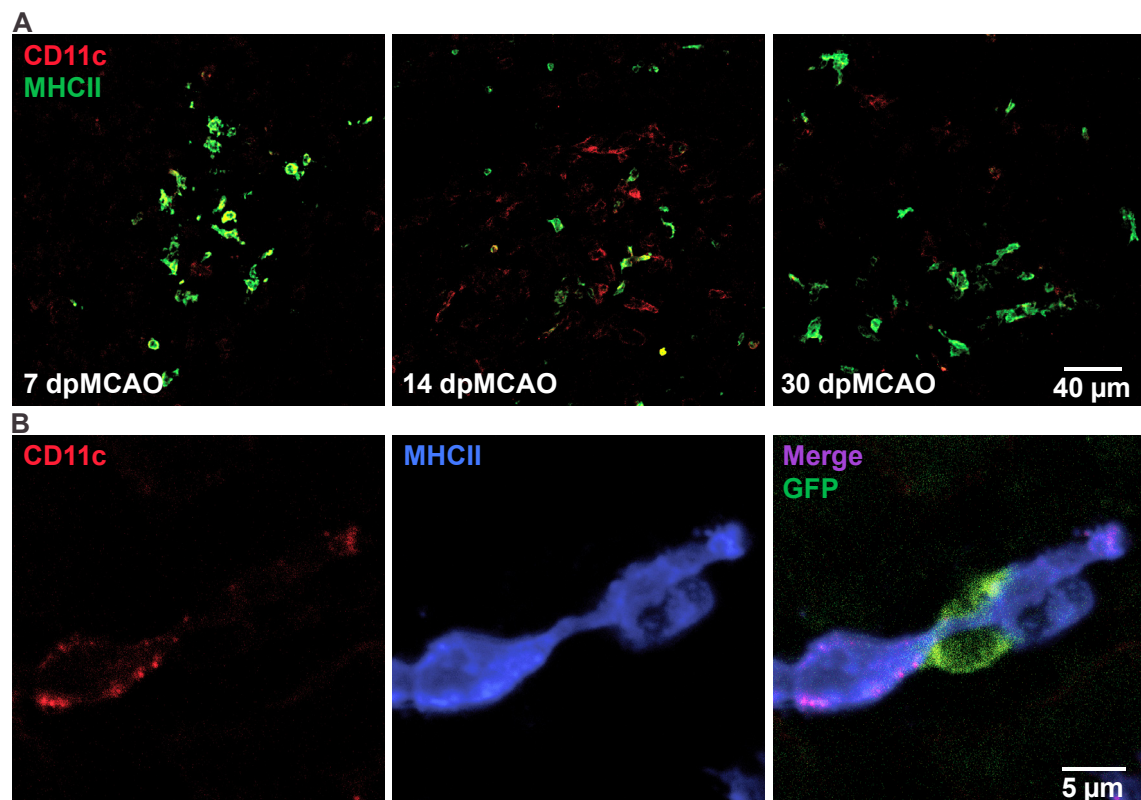


Abb. 30: Immunhistochemischer Nachweis dendritischer Zellen im Infarktgebiet nach MCAO. 7, 14 und 30 Tage MCAO wurden frontale Kryoschnitte aus Foxp3EGFP Reportermäusen mit Antikörper gegen CD11c, MHCII und EGFP gefärbt. Die Untersuchung der gefärbten Schnitte erfolgte unter dem Konfokalmikroskop. (A) Die konfokalen Aufnahmen des Infarktgebietes zeigen lokale Anhäufungen von $CD11c^+$ und $CD11c^+/MHCII^+$ dendritischen Zellen 7, 14 und 30 Tage nach MCAO. (B) $MHCII^+$ dendritischen Zellen stehen in Zellkontakt mit $EGFP^+$ Tregs.

Ergebnisse

Iba1⁺/MHCII⁺ Zellen konnten an den Tagen 7, 14 und 30 im Infarktgebiet detektiert werden. Auffällig war, dass an den Tagen 14 und 30 nach MCAO eine Zunahme der Iba1⁺ und Iba1⁺/MHCII⁺ Zellen in der ischämischen Hemisphäre im Vergleich zu Tag 7 zu beobachten war (Abb. 31A). Auch hier konnte ein Zellkontakt der EGFP⁺ Tregs mit den Iba1⁺/MHCII⁺ Zellen im Infarktgebiet gesehen werden (Abb. 31B).

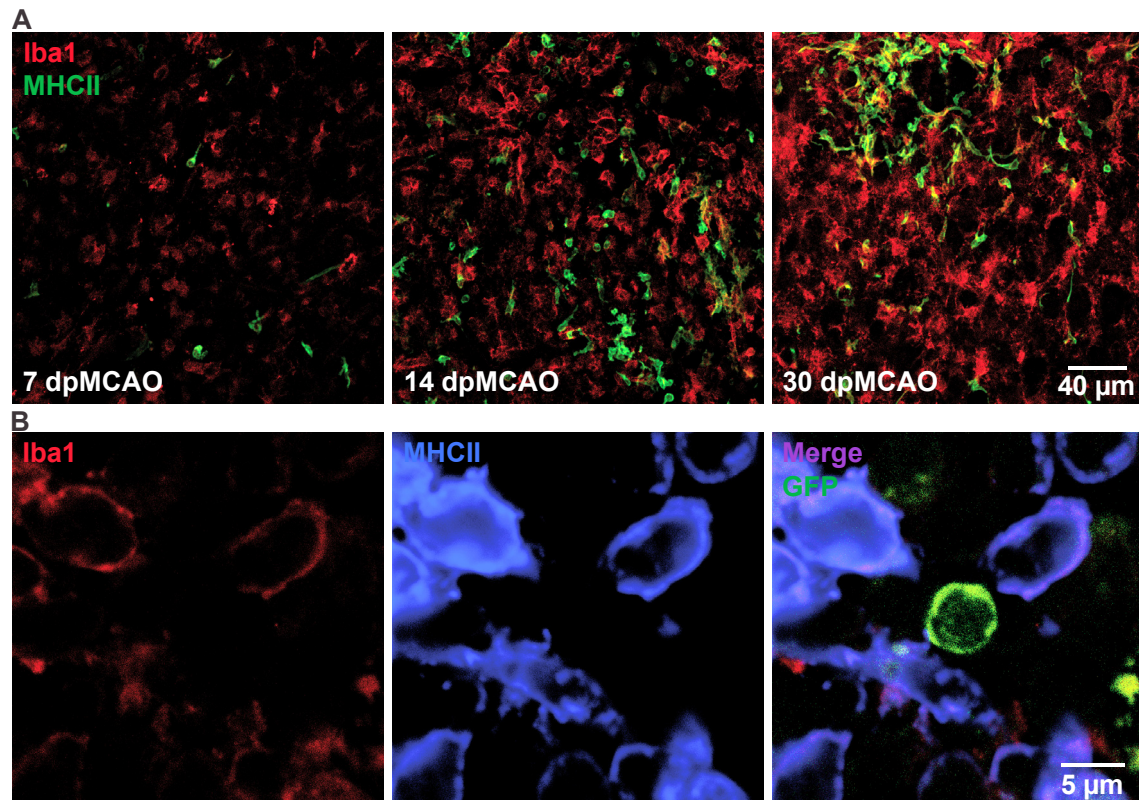


Abb. 31: Immunhistochemischer Nachweis Iba1⁺ monozytärer Immunzellen. Frontale Kryoschnitte von Foxp3EGFP Reportermäusen wurden 7, 14 und 30 Tage nach MCAO mit Antikörper gegen Iba1, MHCII und EGFP gefärbt. Die Untersuchung der gefärbten Schnitte erfolgte unter dem Konfokalmikroskop. (A) Am Tag 7 sind im Infarktgebiet bereits MHCII⁺ monozytäre Immunzellen zu sehen. An den Tagen 14 und 30 ist eine verstärkte Anhäufung Iba1⁺ und Iba1⁺/MHCII⁺ Immunzellen im Infarktgebiet zu erkennen. (B) Die monozytären Immunzellen stehen in Zellkontakt mit den EGFP⁺ Tregs.

3.8 Expression immunologischer Moleküle nach MCAO im Gehirn

Zunächst wurden die Expressionen verschiedener Moleküle aus den post-ischämischen Hemisphären an den Tagen 7, 14 und 30 mit den jeweiligen kontralateralen Hemisphären verglichen (Abb. 32A). Am Tag 7 konnte keine signifikante Hochregulierung der Gene für DC-SIGN (1,1-fach), DC-LAMP(1,2-fach), IFN- γ (1,7-fach), MHCII (4,3-fach), CXCR3 (5,5-fach) und CCR7 (4,0-fach) im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre beobachtet werden. Am Tag 7 war ausschließlich eine Hochregulation des Gens ILT3 (45,3-fach) zu sehen (Abb. 32A). An den Tagen 14 und

30 wurde eine signifikante Hochregulierung der Gene IFN- γ (8,7-fach und 3,4-fach), MHCII (24,1-fach und 12,1-fach), CXCR3 (9,6-fach und 9,1-fach) und ILT3 (134,6-fach und 50,6-fach) detektiert. Zusätzlich war die Expression des MHCII in den ischämischen Hemisphären vom Tag 14 im Vergleich zur ischämischen Hemisphären von Tag 7 signifikant erhöht. Die Expression des ILT3 war am Tag 14 im Vergleich zu den Tagen 7 und 30 am stärksten (Abb. 32A). Ebenfalls war in der ischämischen Hemisphäre am Tag 30 die Expression des CCR7 (20,2-fach) im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Am Tag 14 konnte mit 17,1-facher Expression im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Hochregulierung des CCR7 nachgewiesen werden. Bei dem Vergleich ischämischer Hemisphären vom Tag 30 mit der kontralateralen Seite konnte eine sehr geringe, jedoch signifikante, Erhöhung des DC-SIGN (1,3-fach) detektiert werden (Abb. 32A). Die Hochregulierung des DC-LAMP war zu keinem Zeitpunkt signifikant. Außerdem befand sich die mRNA-Menge der kontralateralen Seite vom Tag 30 unter der Detektionsgrenze, weshalb diese Gruppe nicht in der Auswertung berücksichtigt wurde.

Im nächsten wurden die Expression der gleichen Moleküle aus den post-ischämischen Hemisphären mit den Hemisphären aus der Sham-Kontrolle verglichen (Abb. 32B). In der ischämischen Hemisphäre konnte am Tag 7 eine Hochregulierung der Expression des CXCR3 (43,2-fach) und ILT3 (73,4-fach) im Vergleich zu Sham-Kontrolle detektiert werden. Bei den Genexpressionen des DC-SIGN (1,2-fach), DC-LAMP (1,3-fach), IFN- γ (2,0-fach) und MHCII (13,5-fach) konnte am Tag 7 keine Hochregulierung nachgewiesen werden. Die Expression des CCR7 lag am Tag 7 in der Sham-Kontrolle unter der Detektionsgrenze. Am Tag 14 war in der ischämischen Hemisphäre eine erhöhte Expression des DC-SIGN (7,1-fach), DC-LAMP (10,4-fach), IFN- γ (9,4-fach), MHCII (67,8-fach), CXCR3 (40,8-fach), CCR7 (86,7-fach) und ILT3 (348,7-fach) zu erkennen. Am Tag 30 war die Expression der Gene für IFN- γ (4,8-fach), MHCII (20,6-fach), CXCR3 (18,3-fach), CCR7 (26,7-fach) und ILT3 (67,0-fach) signifikant erhöht (Abb. 32B). Bei DC-SIGN bestand mit 1,3-facher Regulierung am Tag 30 kein Unterschied im Vergleich zur Sham-Kontrolle. Die Expression des DC-LAMP war in der Sham-Kontrolle am Tag 30 unter der Detektionsgrenze. Am Tag 14 war in der ipsilateralen Hemisphäre die Expression des Gens DC-SIGN im Vergleich zu den Tagen 7 und 30 am stärksten. IFN- γ wurde am Tag 14 im Vergleich zu Tag 7 stärker exprimiert. Die Expression des ILT3 war am Tag 14 nach MCAO im Vergleich zu den Tagen 7 und 30 am stärksten (Abb. 32B).

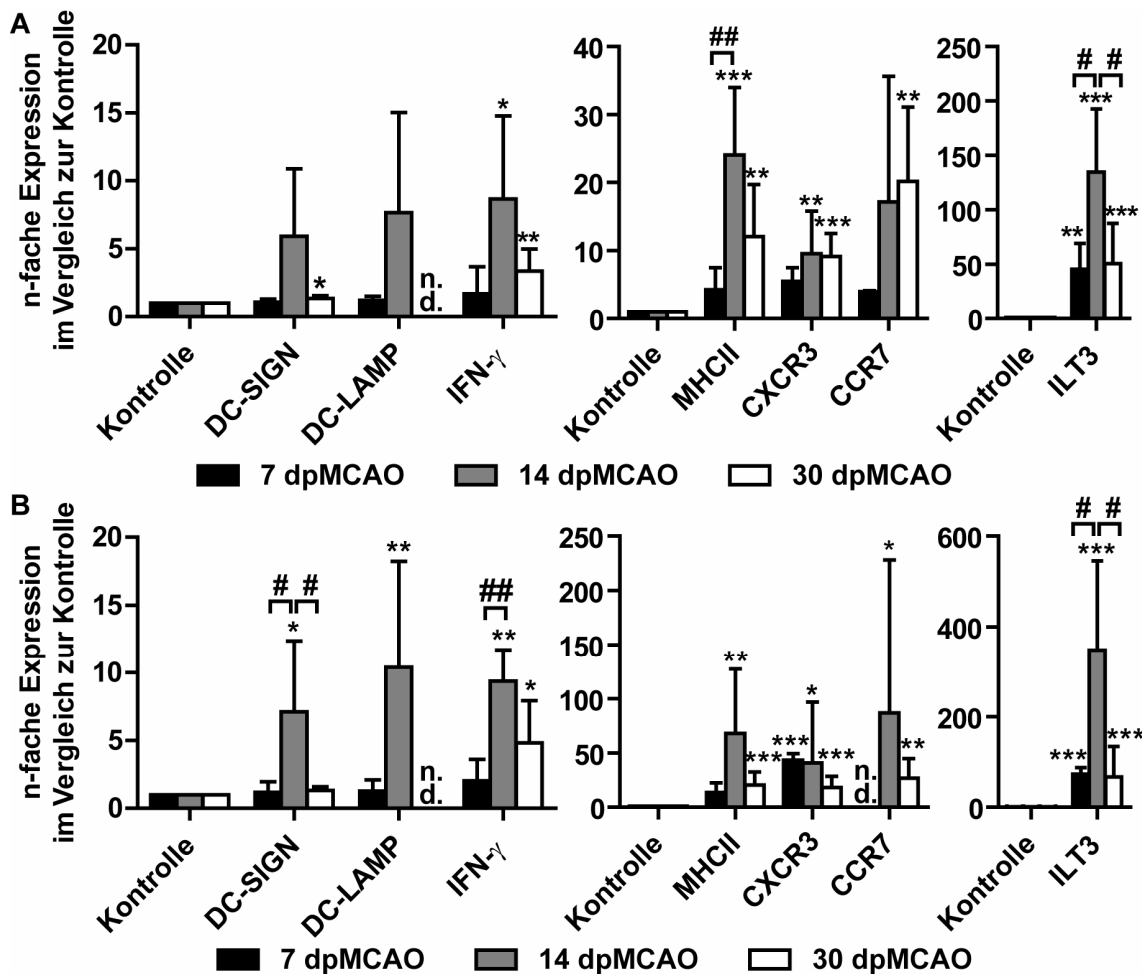


Abb. 32: Genexpression diverser Moleküle nach MCAO im Gehirn. Für die Auswertung der Daten wurde die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode verwendet mit HPRT als Haushaltsgen. Die n-fache Expression diverser Moleküle in der ischämischen Hemisphäre 7, 14 und 30 Tage nach MCAO (dpMCAO) wurde im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle berechnet. Die Kontrollen sind in (A) kontralaterale Hemisphären und in (B) Hemisphären aus Sham-Mäusen. Dargestellt ist die n-fache Expression ($= 2^{-\Delta\Delta CT}$) gegenüber der jeweiligen Kontrolle als Mittelwerte und SD. Für den Vergleich der ischämischen Hemisphären mit kontralateralen Hemisphären wurde der paarige Student t-Test und beim Vergleich mit der Sham-Kontrolle der unpaarige Student t-Test verwendet (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). Für den multiplen Vergleich der ischämischen Hemisphären von den Tagen 7, 14 und 30 wurde ANOVA mit Tukey Post Hoc Test verwendet (# $P < 0,05$; ## $P < 0,01$). N = 3–5 pro Gruppe. N.d. = nicht detektierbar und dpMCAO = Tage nach MCAO.

3.8.1 IL-2 wird im ischämischen Gehirn exprimiert

IL-2 wird in der Literatur als ein wichtiges Zytokin für die Funktion, Homeostasis und Proliferation von Tregs beschrieben (Fontenot et al., 2005b; Setoguchi et al., 2005). Die Expression des Gens IL-2 konnte in kontralateralen Hemisphären aus Mäusen mit MCAO und Hemisphären aus der Sham-Kontrolle nicht detektiert werden. Deswegen lässt sich die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode in diesem Fall nicht auf IL-2 anwenden, da keine Kontrollgruppe zur Berechnung der n-fachen Expression in ischämischen Hemisphären verfügbar ist. Aus diesem Grund wurden die C_T -Werte von IL-2 in ischämischen

Hemisphären mit dem Haushaltsgen HPRT normalisiert und die Expression der IL-2 mRNA als $2^{-\Delta CT}$ -Werte dargestellt.

Eine Expression der IL-2 mRNA konnte an den Tagen 14 und 30, jedoch nicht am Tag 7, nach MCAO in der ischämischen Hemisphäre detektiert werden. Zwischen den Tagen 14 und 30 ließ sich kein Unterschied in der Expressionsstärke des IL-2 beobachten (Abb. 33).

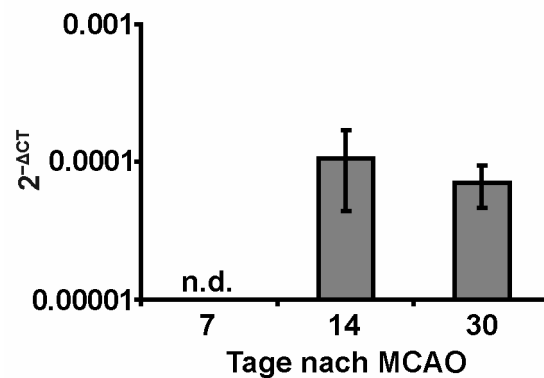


Abb. 33: Expression der IL-2 mRNA in ischämischen Hemisphären. Mittelwerte \pm SD der $2^{-\Delta CT}$ -Werte sind auf eine logarithmisch skalierte y-Achse aufgetragen. N = 3–5 pro Gruppe. Vergleich der ischämischen Hemisphären vom Tag 14 mit Tag 30 durch den Student t-Test. N.d. = nicht detektierbar.

3.9 Funktionalität Foxp3EGFP⁺/CD25⁺ Tregs nach MCAO

Innerhalb der ersten Woche nach MCAO konnte in der Studie von Liesz et al. (2009a) eine zerebroprotektive Wirkung der CD25⁺ Tregs nachgewiesen werden. Die Depletion der CD25⁺ Tregs vor der MCAO führte in dieser Studie zu größeren Infarkt volumina, schlechtere funktionelle Erholung und verstärkte die Aktivierung von Immunzellen. In der hier vorliegenden Studie sollte die späte Wirkung von CD25⁺ Tregs überprüft werden. Aus diesem Grund wurde mit der Injektion des depletierenden Antikörpers in Foxp3EGFP Reportermäuse drei Tage nach MCAO begonnen und am Tag 14 wiederholt (siehe Versuchsübersicht in Abb. 9). Möglicherweise führt die tolerogene Wirkung autoreaktiver CD25⁺/Foxp3⁺ Tregs zu einer lang anhaltenden Protektion des Gehirns und beeinflusst die neuronale Regeneration. Diese Annahmen sollte über die Untersuchung der Infarkt volumina mit dem MRT an den Tagen 3 und 27 nach MCAO und der Ganganalyse an den Tagen 14 und 27 nach MCAO überprüft werden. Zusätzlich haben die Tregs möglicherweise einen direkten Einfluss auf die Akkumulation und Aktivierung von Immunzellen in der ipsilateralen Hemisphäre. Aus diesem Grund wurde am Tag 30 nach MCAO eine durchflusszytometrische Analyse der Immunzellen im Gehirn vorgenommen.

3.9.1 Foxp3EGFP⁺/CD25⁺ Tregs sind nach Injektion des anti-CD25 reduziert

In der mit dem monoklonalen Antikörper anti-CD25 behandelten Gruppe war im Blut am Tag 9 nach MCAO der prozentuale Anteil Foxp3EGFP⁺/CD25⁺ Tregs im Vergleich zur Isotypkontrolle um ca. 74% reduziert (Abb. 34). Am Tag 30 nach MCAO waren in der anti-CD25 Gruppe im Blut die Foxp3EGFP⁺/CD25⁺ Tregs um ca. 36 % reduziert. Ebenfalls waren am Tag 30 die Foxp3EGFP⁺/CD25⁺ Tregs der anti-CD25 Gruppe in der ischämischen Hemisphäre um ca. 20 %, in den zervikalen LK um ca. 16 % und in der Milz um ca. 32 % im Vergleich zur Isotypkontrolle reduziert (Abb. 34).

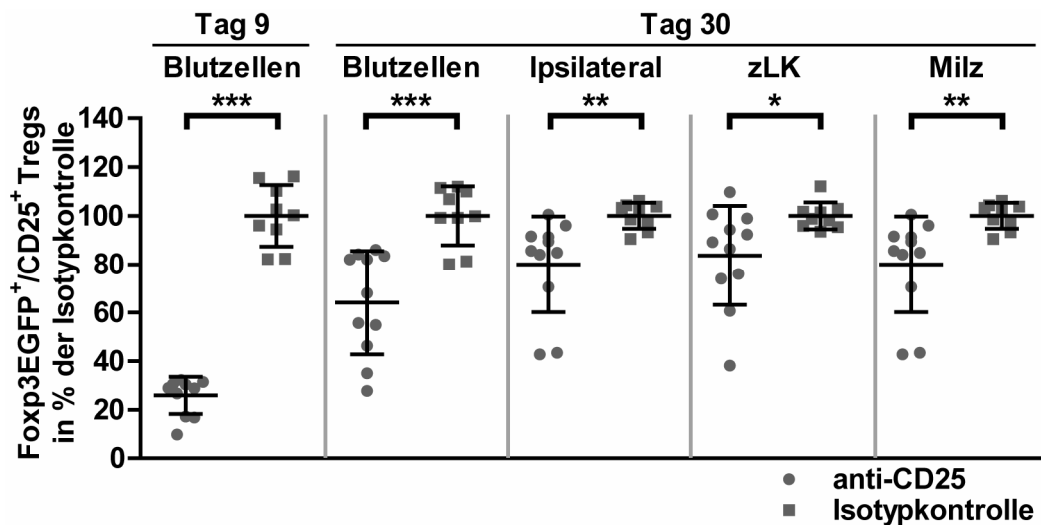


Abb. 34: Durchflusszytometrische Analyse der Foxp3EGFP⁺/CD25⁺ Tregs 9 und 30 Tage nach MCAO. Der prozentuale Anteil der CD25⁺ Zellen in der Foxp3EGFP⁺ Gesamtpopulation wurde bestimmt und der Mittelwert der Isotypkontrolle als 100% gesetzt. Zur Ermittlung der prozentualen Reduktion der Foxp3EGFP⁺/CD25⁺ Tregs in der anti-CD25 Gruppe wurden die einzelnen Datenpunkte aus der anti-CD25 Gruppe und der Isotypkontrolle im Verhältnis zu dem 100 % Mittelwert der Isotypkontrolle berechnet. Am Tag 9 wurde Blut und am Tag 30 Blut, ipsilaterale Hemisphären, zervikale LK (zLK) und Milzen analysiert. Verglichen wurde jeweils die anti-CD25 Gruppe (N= 11) mit der Isotypkontrolle (n = 9; Student t-Test, *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001). Dargestellt sind Mittelwerte ± SD.

3.9.2 Läsionsvolumina nach anti-CD25 Injektion

An den Tagen 3 und 27 nach MCAO wurden Messungen der Gehirne am MRT durchgeführt und daraus die Läsionsvolumina abgeleitet (siehe Kapitel 2.2.6.3 und Abb. 10). Am Tag 3 nach MCAO betrug der Median des korrigierten Läsionsvolumen der anti-CD25 Gruppe 37,1 mm³ und der Isotypkontrolle 37,64 mm³. Am Tag 27 betrug der Median 43,5 mm³ bei der anti-CD25 Gruppe und 36,1 mm³ bei der Isotypkontrolle. Es konnte zu keinem Zeitpunkt nach der MCAO ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden (Abb. 35A). Zum Ausgleich der Varianz zwischen den Läsionsvolumina, welche durch die Operation und durch die biologische Variabilität bedingt ist, wurde ein relatives Läsionsvolumen berechnet. Hierfür wurde

das finale Läsionsvolumen (Tag 27) jeder Maus prozentual im Verhältnis zum initialen Läsionsvolumen (Tag 3) berechnet. Der Median des relativen Läsionsvolumen betrug bei der anti-CD25 Gruppe 117,0% und bei der Isotypkontrolle 110,2%. Bei dem statistischen Vergleich der beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 35B).

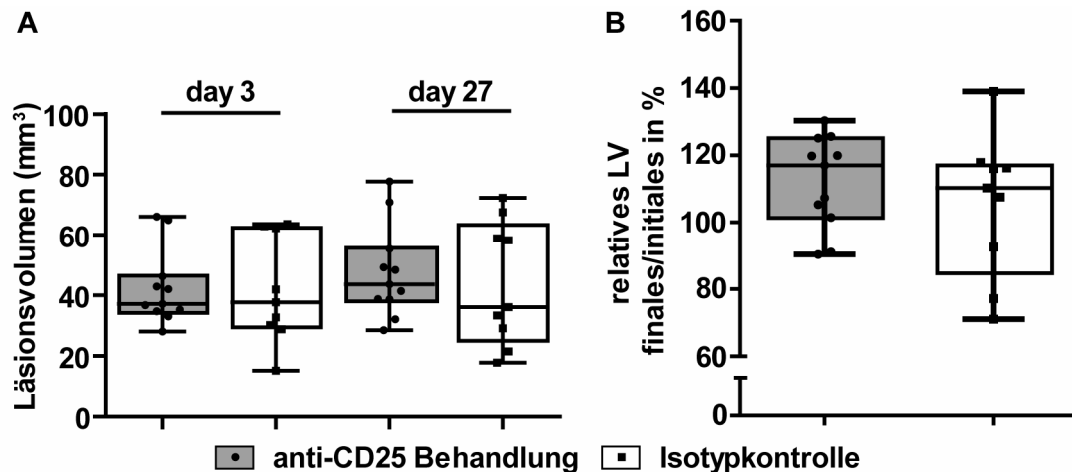


Abb. 35: Mit dem MRT ermittelte Läsionsvolumen (LV) nach MCAO. An den Tagen 9 und 14 nach MCAO wurde den Mäusen der monoklonale Antikörper anti-CD25 oder die Isotypkontrolle verabreicht. (A) Läsionsvolumina an den Tagen 3 und 27 nach MCAO. Am Tag 27 nach MCAO ließ sich kein Unterschied zwischen anti-CD25 Gruppe und Isotypkontrolle erkennen. (B) Dargestellt ist das relative Läsionsvolumen in %. Hierfür wurde das finale Läsionsvolumen im prozentualen Verhältnis zum initialen Läsionsvolumen berechnet. Bei dem Vergleich der anti-CD25 Gruppe und der Isotypkontrolle ließ sich kein Unterschied feststellen. In (A) und (B) sind die Daten als Boxplots mit Median, oberen und unteren Quartilen und Spannweite dargestellt. N = 11 für die anti-CD25 Gruppe und n = 9 für die Isotypkontrolle.

3.9.3 Gangverhalten nach MCAO mit anti-CD25 Injektion

Nach einer MCAO finden langfristig Veränderungen im Gangverhalten der Mäuse statt. Die MCAO führt bei Mäusen während des Ganges zu einer Veränderung der Schwunggeschwindigkeit, dem Duty-Cycle und der maximalen Kontaktfläche der Hinterpfoten, welche sich besonders auf der kontralateralen Körperseite beobachten lässt. Zusätzlich kommt es während des Ganges zu einer erhöhten Standdauer der Vorderpfoten und zu einer veränderten Phasendispersion, ein Parameter zum Ermitteln der Koordination zwischen den Pfoten (Hetze et al., 2012). Zur Durchführung einer Ganganalyse nach einer Depletion der CD25⁺ Tregs wurden an den Tagen 14 und 27 nach MCAO Parameter im Gangverhalten untersucht, die durch eine MCAO beeinträchtigt sind (siehe Kapitel 2.2.6.4).

In der Phasendispersion zwischen linker Vorderpfote und der rechten Hinterpfote war am Tag 14 eine Veränderung im Vergleich zur Grundlinie zu sehen. Bei dem direkten Vergleich der anti-CD25 Gruppe und der Isotypkontrolle an den Tagen 14 und 27 nach MCAO konnte jedoch kein Unterschied in der Phasendispersion beobachtet werden

Ergebnisse

(Abb. 36A). Ähnliche Ergebnisse waren in dem Regularitätsindex, welcher ebenfalls Rückschlüsse auf die Koordination des Ganges zulässt, zu erkennen (Abb. 36B). Bei dem Vergleich der maximalen Kontaktfläche der rechten Hinterpfote war eine Verminderung in beiden Gruppen an den Tagen 14 und 27 nach MCAO im Vergleich zur Grundlinie zu sehen. Zusätzlich war ein verminderter Einsatz der rechten Hinterpfote, angezeigt durch den Parameter Duty-Cycle, nach MCAO zu sehen. Hinsichtlich der maximalen Kontaktfläche und des Duty-Cycles war jedoch ebenfalls keine Veränderung durch die Depletion der CD25⁺ Tregs feststellbar (Abb. 36C und Abb. 36D). Bei der Untersuchung der normalisierten Schwunggeschwindigkeit der rechten Hinterpfote und der Standdauer der rechten Vorderpfote, welche nach der MCAO verändert sind, waren keine Unterschiede zwischen anti-CD25 Gruppe und Isotypkontrolle zu sehen (Abb. 36E und Abb. 36F).

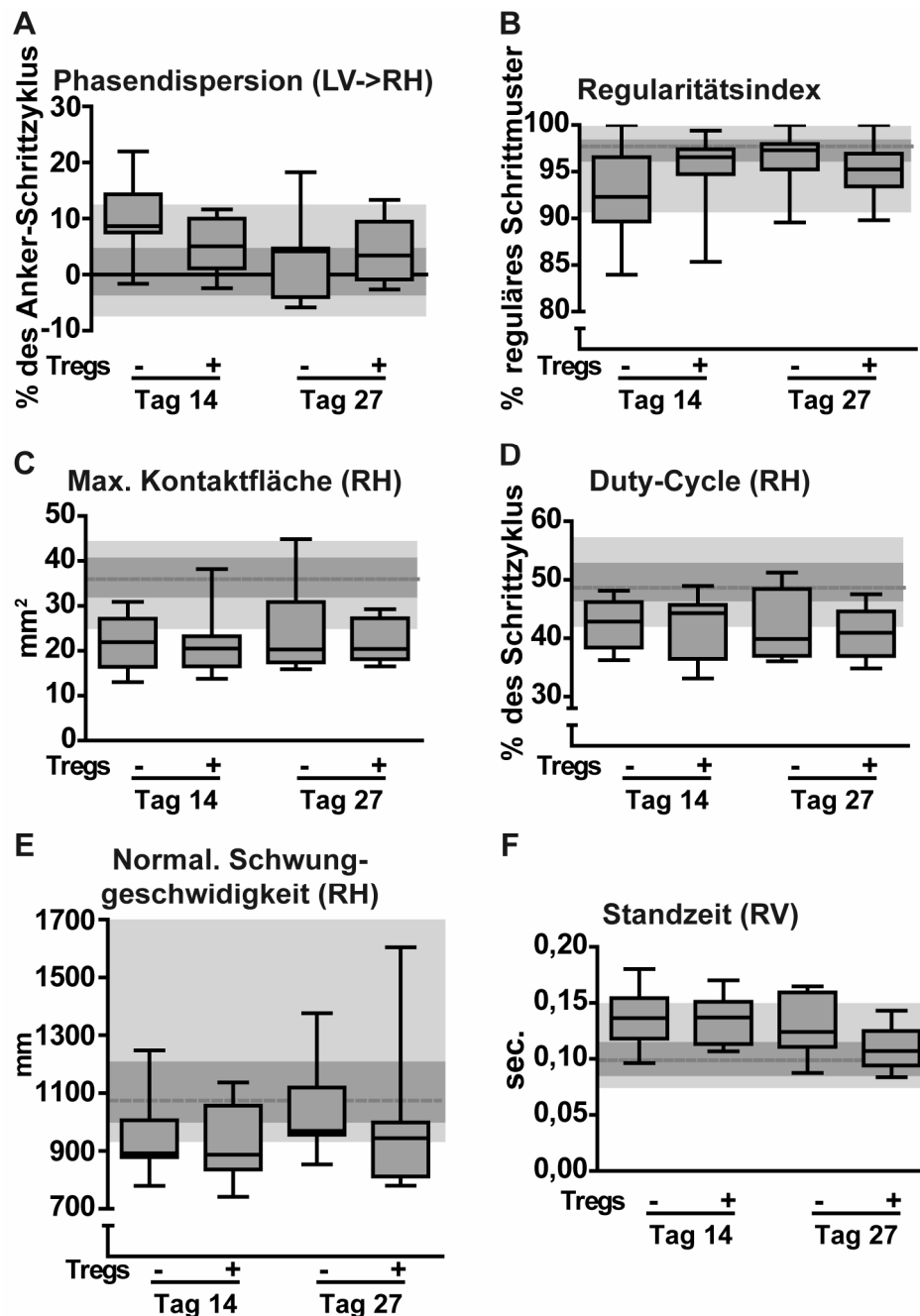


Abb. 36: Die analysierten Parameter der Ganganalyse der anti-CD25 (-) Gruppe wurden mit der Isotypkontrolle (+) verglichen. (A) Phasendispersion von der linken Vorderpfote (LV) zur rechten Hinterpfote (RH). (B) Regularitätsindex. (C) Maximale Kontaktfläche und (D) Duty-Cycle der rechten Hinterpfote (RH). (E) Normalisierte Schwunggeschwindigkeit der rechten Hinterpfote (RH). (F) Standzeit der rechten Vorderpfote (RV). (A-F) Die Daten sind als Boxplots mit 5 – 95 Perzentilen als Whisker dargestellt. Die vor der MCAO aufgenommenen Werte zur Ermittlung der Grundlinie sind im Hintergrund als grauer Diagrammblock dargestellt. Die gepunktete Linie stellt den Median dar. Im dunkleren Grau ist oberes und unteres Quartil und im helleren Grau sind die 5–95 Perzentile dargestellt. Vergleich der Effektgrößen mit dem Student t-Test. N = 11 für die anti-CD25 Gruppe und n = 9 für die Isotypkontrolle.

3.9.4 Infiltration der Immunzellen und Aktivierung der Mikroglia im ischämischen Gehirn nach anti-CD25 Injektion

Zur Überprüfung der Auswirkung einer Depletion der CD25⁺ Tregs auf Immunzellen im Gehirn nach MCAO wurden Zellsuspensionen aus ischämischen Hemisphären am Tag

Ergebnisse

30 mit dem Durchflusszytometer analysiert. Bei dem Vergleich post-ischämischer Hemisphären der Gruppe mit dem Antikörper anti-CD25 und der Isotypkontrolle konnte in der Anzahl $CD45^{dim}/CD11b^{+}$ Mikroglia, $CD45^{high}/CD11b^{+}$ Zellen und $CD4^{+}$ T-Zellen kein Unterschied nachgewiesen werden (Abb. 37A-C). Außerdem war bei dem Vergleich der anti-CD25 Gruppe und der Isotypkontrolle in dem prozentualen Anteil $MHCII^{+}$ Mikroglia kein Unterschied zu sehen (Abb. 37D).

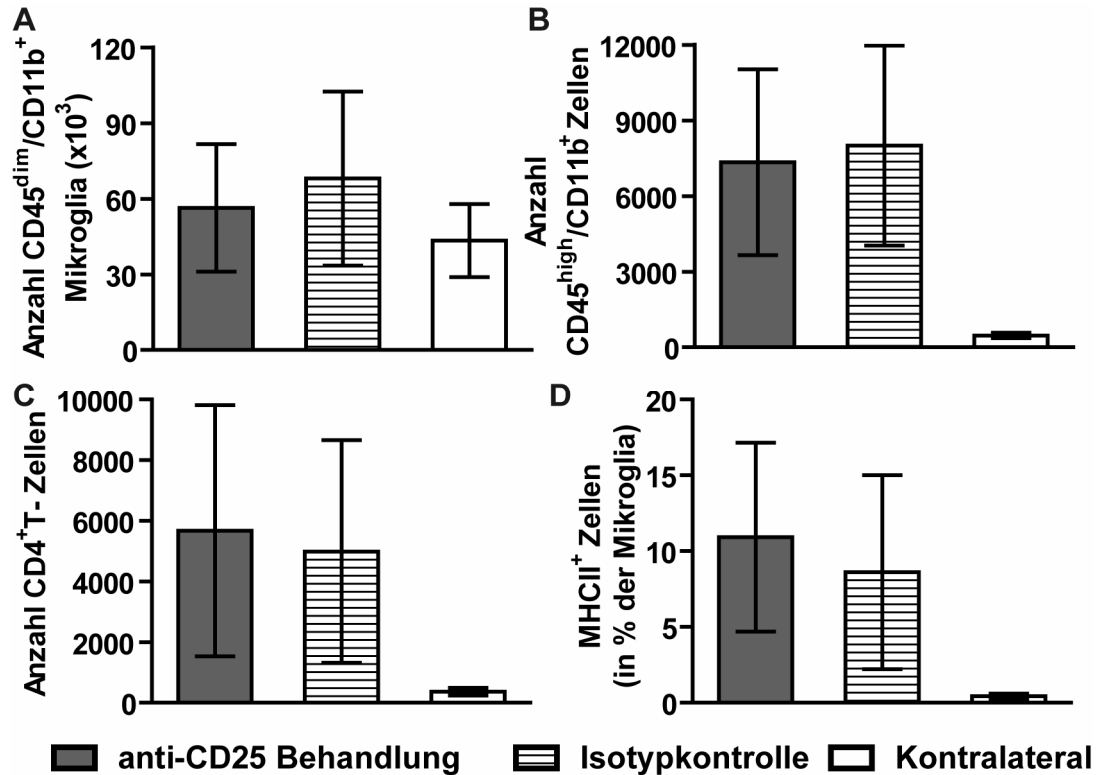


Abb. 37: Durchflusszytometrische Analyse der Zellsuspensionen aus ischämischen Hemisphären 30 Tage nach MCAO. Dargestellt sind Daten aus ischämischen Hemisphären der anti-CD25 Gruppe und der Isotypkontrolle. Daten der kontralateralen Hemisphäre sind aus der Gruppe der Isotypkontrolle. Anzahl (A) $CD45^{dim}/CD11b^{+}$ Mikroglia, (B) $CD45^{high}/CD11b^{+}$ Zellen und (C) $CD4^{+}$ T-Zellen. (D) Prozentualer Anteil der $MHCII^{+}$ Zellen in der Mikroglia Population. (A-D) Verglichen wurden ischämische Hemisphären der anti-CD25 Gruppe ($n = 11$) mit der Isotypkontrolle ($n = 9$) mit dem Student t-Test. Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt.

3.9.5 Anti-CD25 Injektion führt zu einem verminderten Anteil aktivierter $CD4^{+}$ T-Zellen

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung des monoklonalen Antikörpers gegen CD25 während einer inflammatorischen Immunantwort zu einer Reduzierung in der Anzahl aktivierter $CD4^{+}$ T-Zellen, welche transient CD25 exprimieren können, führen kann (Couper et al., 2009). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach einer MCAO der prozentuale Anteil aktivierter $CD4^{+}$ T-Zellen in der ischämischen Hemisphäre erhöht ist (Abb. 18). Aus diesem Grund wurde als nächstes der Anteil aktivierter $CD4^{+}$ T-Zellen im Blut, Gehirn und

lymphatischen Organen nach MCAO mit anti-CD25 Injektion untersucht und mit der Isotypkontrolle verglichen. An den Tagen 9 und 30 nach MCAO war eine sehr geringe Anzahl CD25⁺/Foxp3EGFP⁻ Zellen im Blut zu sehen (Abb. 38A), weshalb ein Vergleich der anti-CD25 Gruppe und Isotypkontrolle in dem Fall nicht möglich war. In ischämischen Hemisphären, zervikalen LK und Milz war am Tag 30 nach MCAO eine ausreichende Menge aktivierter CD4⁺ T-Zellen mit dem Durchflusszytometer detektierbar (Abb. 38B). Bei dem Vergleich der anti-CD25 Gruppe mit der Isotypkontrolle war in der anti-CD25 Gruppe in den zervikalen LK und Milz ein verminderter Anteil CD25⁺/Foxp3EGFP⁻/CD4⁺ Zellen zu beobachten. Zwischen den ischämischen Hemisphären der Gruppe mit anti-CD25 und der Isotypkontrolle war kein Unterschied in dem Anteil aktivierter CD4⁺ T-Zellen zu sehen (Abb. 38C).

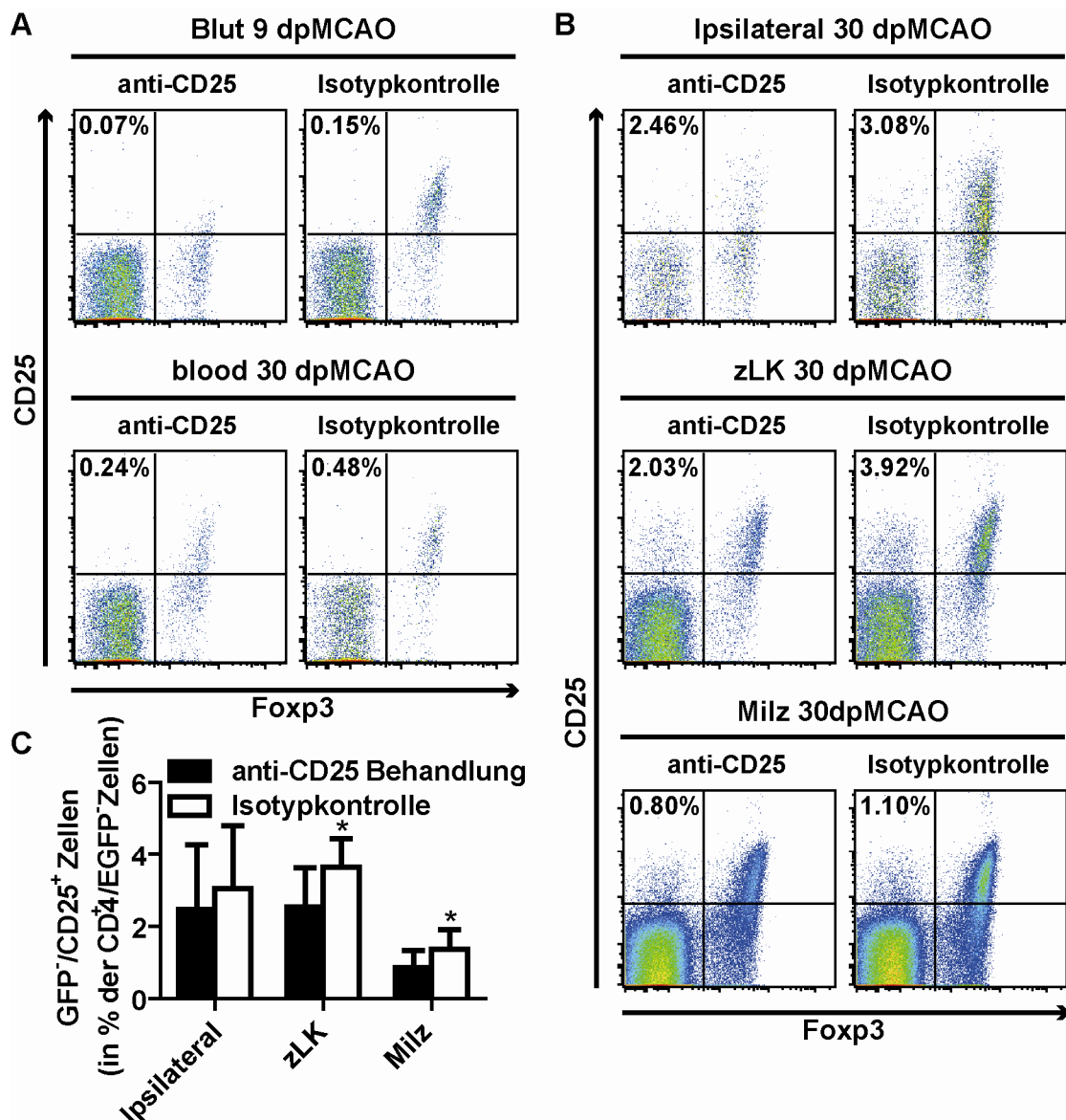


Abb. 38: Durchflusszytometrische Analyse der aktivierten CD4⁺ T-Zellen in der anti-CD25 Gruppe und der Isotypkontrolle. Hierfür wurde der prozentuale Anteil CD25⁺ T-Zellen (= aktivierte CD4⁺ T-Zellen) in der CD4⁺/EGFP⁻ Zellpopulation bestimmt. (A) Repräsentative Dotplots aus Blutzellen von den Tagen 9 und 30 nach

Ergebnisse

MCAO. Der prozentuale Anteil der aktivierten CD4⁺ T-Zellen ist im Blut sehr gering. (B) Repräsentative Dotplots von Proben aus ipsilateralen Hemisphären, zervikalen LK (zLK) und Milz am Tag 30 nach MCAO. (C) Statistischer Vergleich der ipsilateralen Hemisphären, zervikalen LK (zLK) und Milz aus der anti-CD25 Gruppe mit der Isotypkontrolle. Der Student t-Test wurde für den Vergleich beider Gruppen mit *P<0,05 angewendet. Dargestellt sind Mittelwerte und SD. N=11 für anti-CD25 und n=9 für die Isotypkontrolle.

4 Diskussion

Die aufgestellte Hypothese konnte in dieser Studie zum Teil bestätigt werden. Es wurde erstmalig gezeigt, dass nach Läsion im Gehirn eine Expansion von Foxp3⁺ Tregs durch Proliferation stattfindet. Diese Expansion ging mit einer Akkumulation von peripheren Leukozyten und lokalen Mikroglia einher. An den Tagen 14 und 30 nach MCAO konnte eine besonders starke Akkumulation von CD4⁺ T-Zellen und Mikroglia in der post-ischämischen Hemisphäre beobachtet werden. Durch den Kontakt der Foxp3⁺ Tregs mit MHCII Molekülen im Gehirn kann lokal eine antigenspezifische Reaktivierung stattfinden. In diesem Zusammenhang konnte eine lokale Proliferation von Foxp3⁺ Tregs nach Ischämie im Gehirn beobachtet werden. Zusätzlich wurden Faktoren im Gehirn exprimiert, die bei Inflammation, Rekrutierung von Immunzellen und Toleranzinduktion eine Rolle spielen. Diese Beobachtungen sind neu und beschreiben eine späte Immunreaktion im Gehirn, die bisher noch weitgehend unerforscht ist. Im letzten Abschnitt dieser Studie sollte der Einfluss der CD25⁺ Tregs auf neurologische und funktionelle Endpunkte bis zu 30 Tage nach MCAO analysiert werden. Nach einer Depletion der CD25⁺ Tregs konnte kein Unterschied in den Infarkt volumina, der Ganganalyse und den Immunzellen im Gehirn im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Demnach bleibt die Frage offen, welche funktionelle Bedeutung CD4⁺ Tregs zu späten Zeitpunkten nach Läsion haben.

4.1 Immunantwort nach entorhinaler Kortexläsion

Immunhistochemisch können CD4⁺ T-Zellen bis zu 90 Tage nach ECL im Parenchym des Gehirns nachgewiesen werden (Bechmann et al., 2001). Gleichzeitig können Myelin-phagozytierenden MHCII⁺ Mikroglia im Parenchym beobachtet werden (Bechmann et al., 2001). MHCII-restringierte Myelin-spezifische CD4⁺ T-Zellen gehören zum normalen T-Zellrepertoire (Burns et al., 1983, 1986; Mazzanti et al., 1998; Schluesener and Wekerle, 1984) und in zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass bei Multipler Sklerose und dem Mausmodell EAE proinflammatorische CD4⁺ T-Zellen spezifisch gegen Myelinproteine neuronale Degeneration verursachen (Weaver et al., 2006; Zamvil and Steinman, 1990). Nach axonaler Läsion können CD4⁺ T-Zellen spezifisch gegen Myelinproteine eine protektive Wirkung entfalten und einen Einfluss auf regenerative Prozesse haben (Hauben et al., 2000; Moalem et al., 1999). Die Wirkung autoreaktiver T-Zellen im Gehirn hängt vom T-Zelltyp und dem Aktivierungsstatus ab (Wolf et al., 2002). In dem ersten Teil der gegenwärtigen Studie wurde die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen und Foxp3⁺ Tregs im lädierten Gehirnbereich nach ECL durchflusszytometrisch bestimmt und es konnte beobachtet werden, dass Foxp3⁺

Tregs an den Tagen 14 und 30 nach ECL im lädierten Gehirnnareal akkumulieren. Foxp3⁺ Tregs sind eine spezialisierte Gruppe immunsuppressorischer T-Zellen, welche zur Eindämmung der Inflammation im ZNS beitragen können (Kohm et al., 2002; Sakaguchi et al., 2008). Demnach kann die Präsenz autoreaktiver Foxp3⁺ Tregs im lädierten Gehirn zu einer langfristig anhaltenden protektiven Autoimmunität führen. Mutlu et al. (2006) konnten zeigen, dass nach ECL die Scores von Mäusen mit einer induzierten EAE vermindert waren. Bislang konnte jedoch kein kausaler Zusammenhang der tolerogenen Wirkung Foxp3⁺ Tregs im Gehirn nach ECL mit der verminderten Inflammation nach Induktion einer EAE nachgewiesen werden.

Die verstärkte Präsenz der Tregs nach ECL an den Tagen 14 und 30 im Vergleich zu Tag 7 und der Peripherie wirft die Frage auf, ob lokal im Gehirn eine Induktion von Tregs über MHCII stattfindet, welche in der Expansion dieses Zelltyps resultiert. In diesem Zusammenhang konnte immunhistochemisch ein Zellkontakt Foxp3⁺ Tregs mit MHCII⁺/Iba1⁺ Zellen nachgewiesen werden. Iba1 ist ein Marker für Mikroglia im gesunden Gehirnparenchym und Mikroglia können den Rezeptor MHCII nach Aktivierung auf der Zelloberfläche exprimieren und somit Antigene präsentieren (Aloisi et al., 2000; Shrikant and Benveniste, 1996). Iba1 ist jedoch auch ein Marker für periphere Leukozyten mit monozytärer Herkunft, wie zum Beispiel Makrophagen (Ito et al., 2001). Eine Schwierigkeit bei der immunhistochemischen Untersuchung von Mikroglia ist demnach, dass nach einer Verletzung des Gehirns diese nach morphologischen Kriterien nicht mehr von den infiltrierten Makrophagen unterscheidbar sind (Babcock et al., 2003). Die Iba1⁺ Zellen in der Umgebung der Läsion könnten demnach Gehirn-residente Mikroglia oder periphere Makrophagen aus der Peripherie oder dem perivaskulären Raum sein (Babcock et al., 2003; Bechmann and Nitsch, 1997a, 1997b; Bechmann et al., 2001).

4.2 Immunantwort nach ischämischer Läsion

Die Anzahl Foxp3⁺ Tregs im Gehirn war nach ECL sehr gering. Aus diesem Grund wurden weitere Fragestellungen in dem Modell der MCAO bearbeitet, da für die *ex vivo* Analyse am Durchflussszytometer eine wesentlich höhere Anzahl Immunzellen im Vergleich zur ECL aus dem Gehirn isoliert werden konnte und somit eine weitere Charakterisierung der Tregs möglich war. Zusätzlich konnten nach ECL in den lymphatischen Organen keine Veränderungen in der CD4⁺ Population beobachtet werden. Durch eine stärkere Aktivierung des Immunsystems nach einer MCAO können deswegen in diesem Modell Auswirkungen auf die CD4⁺ Population und Foxp3⁺ Tregs in der Peripherie besser untersucht werden.

Die Erforschung der Immunreaktionen nach einem ischämischen Infarkt sind von hoher klinischer Relevanz, da durch die lokale Aktivierung von Immunzellen und Infiltration peripherer Leukozyten in das Gehirn eine sekundären Schädigung des neuronalen Gewebes verursacht wird (Nilupul Perera et al., 2006; Wang et al., 2007). Zusätzlich kommt es innerhalb von Tagen nach einem Schlaganfall zu einer systemischen Immundepression, welche als eine wesentliche Ursache für Schlaganfall-assoziierte Infektionen, die mit einer signifikant höheren Letalität verbunden sind, betrachtet wird (Meisel et al., 2005). Die akute Aktivierung des Immunsystems und Akkumulation peripherer und lokaler Immunzellen im Gehirn nach einem ischämischen Infarkt wird in der Literatur sehr ausführlich beschrieben (Gelderblom et al., 2009; Liesz et al., 2009b; Wang et al., 2007). Durch den Zusammenbruch der Bluthirnschranke kurz nach der Ischämie fließen Gehirnantigene in drainierende zervikale LK (van Zwam et al., 2009) und die Infiltration peripherer Leukozyten in das Gehirn wird verstärkt (Gelderblom et al., 2009; Neumann-Haefelin et al., 2000; Wang et al., 2007). In diesem Zusammenhang kann eine Akkumulation von Leukozyten und Mikroglia im ischämischen Hirnareal innerhalb der ersten Woche nach Ischämie beobachtet werden (Gelderblom et al., 2009; Jander et al., 1995; Wang et al., 2007) und es findet eine systemische Immunreaktion statt (Dirnagl et al., 2007; Offner et al., 2005, 2006; Prass et al., 2003; Wang et al., 2007). Innerhalb von Stunden lassen sich bereits erhöhte Mengen an Zytokinen, Chemokinen und Chemokinrezeptoren im Gehirn nachweisen (Offner et al., 2005). In der akuten Phase nach MCAO sind es Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen und Neutrophile, und Toll-like-Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die aktiviert werden (Chamorro et al., 2012). Die Aktivierung von T- und B-Zellen, den Zellkomponenten des adaptiven Immunsystems, ist in der akuten Phase unspezifisch (Kleinschnitz et al., 2010). Zusätzlich haben die T-Zellen einen langfristigen Einfluss auf den neurologischen Genesungsprozess und eine mukosale Immunisierung vor der Ischämie mit Gehirnantigenen kann den Genesungsprozess durch eine Tregs ausgerichtete T-Zellantwort fördern (Gee et al., 2008, 2009). Es finden in der Tat spezifische Immunantworten gegen Gehirnantigene statt, denn die Anzahl der T-Zellen mit Immunreaktivität gegen MBP ist in Patienten nach einem Schlaganfall in der Peripherie erhöht (Wang et al., 1992). Die Rolle von autoreaktiven Foxp3⁺ Tregs im post-akuten Verlauf des (experimentellen) Schlaganfalls ist weitgehend unbekannt.

4.2.1 T-Zellen im Gehirn und in der Peripherie nach MCAO

Interessanterweise ließ sich nach MCAO, ähnlich wie nach einer ECL, eine sehr starke Akkumulation der CD4⁺ T-Zellen mit einem Anstieg des Anteils Foxp3⁺ Tregs an den Tagen 14 und 30 beobachten. Diese Beobachtung ließ sich demnach in zwei

unabhängigen Modellen mit unterschiedlichen auf das Gehirn wirkenden pathologischen Stimuli reproduzieren. In der hier vorgelegten Arbeit konnte zum ersten Mal nach MCAO eine späte Infiltration und Akkumulation peripherer Lymphozyten im Gehirn beobachtet werden, welche zeitlich getrennt von der ersten in der Literatur beschriebenen Akkumulation von T-Lymphozyten abläuft (Stubbe et al., 2013).

Neben der Akkumulation Foxp3⁺ Tregs waren im post-ischämischen Gehirn vermehrt aktivierte CD4⁺ Effektor-T-Zellen zu sehen (Abb. 18) und an den Tagen 14 und 30 konnte in der ischämischen Hemisphäre eine erhöhte Expression der mRNA des Zytokins IFN- γ detektiert werden (Abb. 32). In der ersten Woche nach MCAO tragen CD4⁺ Th1-Zellen durch die Sekretion von IFN- γ zur Inflammation im Gehirn bei (Liesz et al., 2009a). Weitere Quellen für IFN- γ im Gehirn können CD8⁺ Zellen und natürliche Killerzellen in der akuten Phase nach MCAO sein (Yilmaz et al., 2006). Die Rolle aktivierter CD4⁺ T-Zellen und die Wirkung des Zytokins IFN- γ zwischen den Tagen 7 und 30 nach einem Schlaganfall sind bislang unerforscht. Die Antwort der CD4⁺ Effektor-T-Zellen kann in Abhängigkeit des Subtyps unterschiedliche Auswirkungen auf das lokale Immungeschehen im Gehirn haben. Th1- und Th17-Zellen sekretieren proinflammatorische Zytokine und vermitteln destruktive Autoimmunität und führen zu Neurodegeneration wie bei der Multiplen Sklerose und EAE (Weaver et al., 2006; Zamvil and Steinman, 1990). Th2-Zellen vermitteln protektive Autoimmunität und können Regenerationsprozesse nach einer Läsion fördern (Jäger and Kuchroo, 2010; Korn et al., 2009). Der Einfluss der aktivierten CD4⁺ T-Zellen ab Tag 7 nach MCAO wurde in dieser Doktorarbeit nicht näher untersucht und es bleibt die Frage offen, ob CD4⁺ T-Zellen zwischen den Tagen 7 und 30 nach MCAO eine Quelle für das proinflammatorische Zytokin IFN- γ im Gehirn sind.

In einem weiteren Versuch wurden Veränderungen in der Beschaffenheit des TCR auf CD4⁺ T-Zellen in lymphatischen Organen und im Gehirn untersucht, um einen möglichen Rückschluss auf die Lokalität spezifischer Aktivierung oder Anergie von CD4⁺ T-Zellen ziehen zu können (Viganò et al., 2012). Der TCR wird während der Ontogenese aus den diskontinuierlichen Gensegmenten V und J in der α -Kette und V, J und D in der β -Kette encodiert. Durch die somatische Rekombination der DNA dieser Segmente entsteht eine hohe Diversität des $\alpha\beta$ -TCR spezifisch gegen eine sehr große Vielfalt an Antigenen (Wilson et al., 1988). Nach einer EAE zum Beispiel können im ZNS vermehrt autoreaktive V β 8.1-TCR⁺/CD4⁺ Zellen mit einem inflammatorischen Phänotyp und enzephalitogenen Eigenschaften detektiert werden (Fazilleau et al., 2006; Madakamutil et al., 2003). In der hier vorgelegten Arbeit wurden exemplarisch zwei Mitglieder der V β -Familie am Tag 14 nach MCAO untersucht. Interessanterweise war nach MCAO ausschließlich im Gehirn, jedoch nicht in den lymphatischen Organen,

der Anteil $CD4^+/Foxp3EGFP^-$ Zellen und $Foxp3EGFP^+$ Tregs, welche positiv für den $V\beta 8.1/8.2$ -TCR waren, signifikant vermindert. Bei dem $V\beta 11$ -TCR war in den lymphatischen Organen kein Unterschied zwischen MCAO und Sham-Kontrolle zu beobachten. Der Anteil $V\beta 11^+$ -TCR war in diesem Fall ausschließlich in der $CD4^+/Foxp3EGFP^-$ Population der post-ischämischen Hemisphäre erhöht. Demnach konnten nach MCAO im Gehirn Veränderungen in der Spezifität der lokalen $CD4$ -Population beobachtet werden.

Neben dem lokalen Immungeschehen im Gehirn konnten in der Peripherie auf zellulärer Ebene Veränderungen nachgewiesen werden. Parallel zur Akkumulation $Foxp3^+$ Tregs im Gehirn wurde am Tag 14 nach MCAO, jedoch nicht an den Tagen 7 und 30, in den LK und der Milz eine erhöhter Anteil $Foxp3^+$ Tregs detektiert. Hinzu kam, dass am Tag 14 nach MCAO die Gesamtzahl der $CD4^+$ Zellen, jedoch nicht der $Foxp3^+$ Tregs, in inguinalen LK und Milz vermindert war. Die Beobachtung, dass nach MCAO die Anzahl Lymphozyten in Milz, Thymus und Blut verringert ist, wird in der Literatur beschrieben (Gendron et al., 2002; Offner et al., 2006; Prass et al., 2003). Neben der Abnahme in der Anzahl Lymphozyten konnte 4 Tage nach MCAO eine Zunahme in dem Anteil der $Foxp3^+$ Tregs in der Milz beobachtet werden (Offner et al., 2006). In Prass et al. (2003) wurden reduzierte Mengen Lymphozyten ab 12 h bis mehrere Wochen nach MCAO in der Milz, Blut und im Thymus nachgewiesen. In der gleichen Studie wurde eine erhöhte Menge apoptotischer Splenozyten und Thymozyten 12 h nach MCAO detektiert. Zusätzlich konnte eine verstärkte Produktion des Zytokins IL-4 von Th2-Zellen im Verhältnis zur Produktion des Zytokins $IFN-\gamma$ von Th1-Zellen beobachtet werden (Prass et al., 2003). Diese Effekte sind ein Resultat der systemischen Immundepression verursacht durch die Aktivierung des sympathischen Nervensystems (SNS), sowie zum Teil der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA) und dadurch anschließenden Freisetzung von Catecholaminen und Glukokortikoiden (Prass et al., 2003). In der hier vorliegenden Studie konnte nach MCAO keine Expansion durch Proliferation und *de novo* Induktion der $Foxp3^+$ Tregs in der Peripherie nachgewiesen werden. Die Veränderungen in dem Anteil $Foxp3^+$ Tregs und die Abnahme der Gesamtzahl $CD4^+$ T-Zellen könnten demnach durch apoptotische Prozesse verursacht sein. Inwiefern, die über den SNS gesteuerte systemische Immundepression und möglicherweise selektiven apoptotischen Prozesse am Tag 14 nach MCAO zu einer Erhöhung des Anteils $Foxp3^+$ Tregs in der Peripherie beitragen, müsste durch weitere Versuche geklärt werden.

4.2.1.1 Expansion $Foxp3^+$ Tregs nach Ischämie im Gehirn

Nach ECL und MCAO konnte eine erhöhter Anteil $Foxp3^+$ Tregs mit einer gleichzeitigen Akkumulation $CD4^+$ T-Zellen im Gehirn nachgewiesen werden. $Foxp3^+$

Tregs hatten direkten Zellkontakt mit MHCII⁺ antigenpräsentierenden Zellen und es wurden auf mRNA-Ebene Faktoren nachgewiesen, die im ischämischen Gehirn die Rekrutierung und Regulation von Immunzellen kontrollieren. Über die Mechanismen, die zu einer Akkumulation von Foxp3⁺ Tregs im post-ischämischen Gehirn führen ist bislang nichts bekannt. Ein möglicher Mechanismus ist die Proliferation. Tregs können nach einer antigenspezifischen Stimulation durch dendritische Zellen (Yamazaki et al., 2003) oder nach einer unspezifischen Stimulation mit IL-2 und Rapamycin zur Proliferation angeregt werden (Battaglia et al., 2005; Shin et al., 2011). Eine weitere Möglichkeit für die Akkumulation von Foxp3⁺ Tregs im Gehirn könnte die *de novo* Generierung induzierter Foxp3⁺ Tregs aus naiven CD4⁺ T-Zellen sein. Neben den natürlich vorkommenden Foxp3⁺ Tregs, welche im Thymus gebildet werden, können in der Peripherie Foxp3⁺ Tregs aus naiven CD4⁺/Foxp3⁻ Zellen durch dendritische Zellen antigenspezifisch *de novo* generiert werden (Kretschmer et al., 2005). Mikroglia sind ebenfalls in der Lage nach einer milden Stimulation Foxp3⁺ Tregs aus naiven CD4⁺/Foxp3⁻ Zellen antigenspezifisch zu generieren (Ebner et al., *submitted*). Im ZNS können Neurone und Astrozyten Foxp3⁺ Tregs aus enzephalitogenen Effektor-T-Zellen bilden (Liu et al., 2006; Trajkovic et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass spezifisch gegen MOG induzierte Foxp3⁺ Tregs die Fähigkeit besitzen eine EAE effektiv zu supprimieren (Selvaraj and Geiger, 2008).

Zunächst wurden die Lymphozyten mithilfe des Proliferationsmarkers Ki-67 analysiert. Ki-67 ist ein Protein, welches ausschließlich in proliferierenden Zellen vorhanden ist, jedoch nicht in ruhenden Zellen (Scholzen and Gerdes, 2000). Ki-67 wurde zuvor schon zur Detektion proliferierender T-Zellen nach Antigenstimulation verwendet (Chen et al., 2010; Soares et al., 2010). An den Tagen 7 und 14 nach MCAO waren im Gehirn um die 60 % der Foxp3⁺ Tregs positiv für Ki-67 (Abb. 19). Eine Möglichkeit ist, dass Foxp3⁺ Tregs in peripheren lymphatischen Organen aktiviert werden und in einen proliferativen Zustand übergehen und in diesem Zustand in das Gehirn infiltrieren, denn Tregs können ohne eine anhaltende Antigenstimulation klonal expandieren (Lee et al., 2008). In den peripheren lymphatischen Organen und im Blut waren jedoch keine Unterschiede in dem Anteil Ki-67⁺ Tregs zu sehen (Abb. 20). Wahrscheinlicher ist, dass in diesem Modell die Proliferation Foxp3⁺ Tregs im Gehirn nach lokaler Reaktivierung stattfand, denn immunhistochemisch konnten Foxp3⁺ Tregs in der Teilungsphase direkt im Infarktgebiet nachgewiesen werden (Abb. 25) und am Tag 14 konnte in der ischämischen Hemisphäre eine Verminderung des Anteils CD25⁺/Foxp3⁺ Tregs in der Foxp3⁺ Population gesehen werden (Abb. 17C). Bei einer Proliferation der Foxp3⁺ Tregs kommt es zur Regulation des CD25 (Fontenot et al., 2005a; Gavin et al., 2001). Zusätzlich wurde in ischämischen Hemisphären eine erhöhte Expression des Zytokins IL-2 detektiert (Abb. 33). IL-2 ist ein wichtiges Zytokin für die Kontrolle der

Proliferation von Tregs (Fontenot et al., 2005b; Setoguchi et al., 2005) und kann die Proliferation der Tregs im Gehirn nach MCAO regulieren. Dass kein IL-2 am Tag 7 detektiert werden konnte lässt sich methodisch begründen, denn die Gesamt-RNA wurde aus ganzen Hemisphären extrahiert und am Tag 7 war nur eine sehr geringe Anzahl Lymphozyten im Gehirn detektierbar.

Um zu überprüfen, ob induzierte Tregs im Gehirn oder in der Peripherie nach MCAO aus naiven $CD4^+/CD45RB^{high}$ Zellen entstehen, wurde eine etablierte Methode des adoptiven Zelltransfers verwendet (Curotto de Lafaille et al., 2004). Nach einer Immunisierung mit dem Peptid MBP kann über die Vermehrung von TGF- β exprimierenden T-Zellen eine immunologische Toleranz gegenüber Gehirnantigenen erwirkt werden (Becker et al., 2003, 1997; Gee et al., 2008). Möglicherweise kann unter normalen Bedingungen eine Induktion über den MOG-spezifischen TCR stattfinden, da Gehirnantigene nach einer Ischämie in die Peripherie freigesetzt werden. Aus diesem Grund wurden im ersten Versuchsansatz naive $CD4^+/CD45RB^{high}$ Zellen mit einem TCR spezifisch gegen MOG sortiert und einen Tag vor der Operation in T- und B-Zelldefiziente Mäuse transferiert. Am Tag 14 nach MCAO ließ sich jedoch keine Neuentstehung von Tregs im Vergleich zur Sham-Kontrolle sehen (Abb. 23A). In dem nächsten Versuchsansatz wurden naive $CD4^+/CD45RB^{high}$ Zellen aus Wildtypmäusen des Stamms C57BL/6J transferiert, um ein natürliches TCR-Repertoire für eine Antwort gegen ein breites Spektrum an Antigenen zu ermöglichen. Gleichzeitig wurden B-Zellen transferiert, um die Defizienz dieser in den $RAG1^{-/-}$ Mäusen zu kompensieren. Bis Tag 14 nach MCAO fand auch in diesem Versuchsansatz keine Neuentstehung von Foxp3⁺ Tregs statt (Abb. 23B). Es ließ sich in beiden Versuchsansätzen eine Akkumulation von $CD4^+$ T-Zellen im Gehirn beobachten, weshalb eine Aktivierung in der Peripherie stattgefunden haben muss. In diesen Versuchsansätzen könnten jedoch Komponenten des Immunsystems fehlen, wie zum Beispiel Gedächtnis-T-Zellen und $CD8^+$ Zellen, die für die Bildung eines molekularen Milieus notwendig sind, welche die Induktion von Tregs nach einer MCAO ermöglichen.

4.2.2 Der Einfluss antigenpräsentierender Zellen nach ischämischer Läsion

In der Peripherie können unreife dendritische Zellen Tregs induzieren und reaktivieren (Guo et al., 2008; Kretschmer et al., 2005; Liang et al., 2005), während im Gehirn Mikroglia nach Aktivierung das Molekül MHCII hoch regulieren, Antigene präsentieren und infiltrierende T-Zellen restimulieren können (Aloisi et al., 2000; Shrikant and Benveniste, 1996). Makrophagen migrieren nach einer Ischämie aus dem Blut in das Infarktgebiet (Gelderblom et al., 2009; Ito et al., 2001). $CD11c^+$ dendritische Zellen

können aus dem Gehirn und der Peripherie stammen und nach einer Ischämie in das Infarktgebiet migrieren (Bulloch et al., 2008; Felger et al., 2010; Proding et al., 2011). An den Tagen 14 und 30 nach MCAO wurde mit dem Durchflusszytometer in der ischämischen Hemisphäre eine verstärkte Akkumulation MHCII⁺ Mikroglia und aktivierter MHCII⁺ Mikroglia nachgewiesen (Abb. 28). Die Akkumulation und Aktivierung der Mikroglia in der ischämischen Hemisphäre fand folglich zeitgleich zur Akkumulation der CD4⁺ Zellen und Foxp3⁺ Tregs statt. In diesem Zusammenhang ließ sich an den Tagen 14 und 30 eine erhöhte Expression der mRNA des MHCII Rezeptors in ischämischen Hemisphären nachweisen (Abb. 32) und mikroskopisch ließ sich eine starke Akkumulation Iba1⁺ und Iba1⁺/MHCII⁺ Zellen im Infarktgebiet nachweisen, wobei die Akkumulation an den Tagen 14 und 30 am stärksten war. Im Gehirn konnte ein direkter Kontakt Foxp3⁺ Tregs zu dem MHCII-Molekül auf CD11c⁺ dendritischen Zellen und Iba1⁺ Zellen detektiert werden (Abb. 30 und Abb. 31). Im Gegensatz zur späten Akkumulation der Mikroglia an den Tagen 14 und 30 war die Anzahl der Makrophagen und dendritischen Zellen an den Tagen 7, 14 und 30 erhöht (Abb. 29). Die Anzahl der Mikroglia war jedoch zu jeder Zeit 10- bis 40-fach höher im Vergleich zur Anzahl der Makrophagen und dendritischen Zellen. In dem Modell der EAE spielen Mikroglia in Abhängigkeit von der Phase des Krankheitsverlaufs eine wichtige Rolle in der Aktivierung und Regulierung der Immunantwort (Almolda et al., 2010). Die frühe T-Zellantwort innerhalb der ersten Tage nach MCAO hängt nicht mit adaptiven Immunmechanismen zusammen (Kleinschnitz et al., 2010). Es könnte jedoch sein, dass zu späten Zeitpunkten nach einer Ischämie Mikroglia über die Präsentation von Antigenen zur Aufrechterhaltung der Tregs-Antwort im Gehirn beitragen.

4.2.3 Expression immunologischer Moleküle nach ischämischer Läsion

Anhand der durchflusszytometrischen und immunhistochemischen Analysen konnte in post-ischämischen Hemisphären an den Tagen 14 und 30 eine besonders starke Akkumulation Foxp3⁺ Tregs und aktivierter Mikroglia im Vergleich zu Tag 7 beobachtet werden. Am Tag 7 war die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen nicht besonders hoch, es ließen sich jedoch ebenfalls vermehrt periphere Leukozyten, wie zum Beispiel Makrophagen und dendritische Zellen, im Gehirn messen. Verschiedene immunologische Moleküle haben eine wichtige Funktion bei der Rekrutierung von Immunzellen an die Inflammationsstelle, bei der Toleranzbildung und bei der Antigenpräsentation. Mit der TaqMan-PCR wurden die mRNA-Expressionen verschiedener Moleküle an den Tagen 7, 14 und 30 gemessen, um einen möglichen Bezug zu der beobachteten Akkumulation peripherer und lokaler Immunzellen im Gehirn herstellen zu können.

Nach ECL lässt sich CXCR3 auf Mikroglia detektieren. Die Signalgebung über den Rezeptor CXCR3, z. Bsp. durch den Liganden IP-10, führt zur Rekrutierung von

Mikroglia an die Läsion (Rappert et al., 2004). Im ischämischen Gehirn lässt sich CXCR3 bis Tag 15 nach MCAO in Abhängigkeit von der Zeit in verschiedenen Konzentrationen messen (Biber et al., 2001; Wang et al., 2000). In humanen Gehirnproben von Schlaganfallpatienten konnte CXCR3 auf Astrozyten lokalisiert werden (Goldberg et al., 2001). Gleichzeitig werden Liganden des CXCR3 im Gehirnparenchym freigesetzt (Wang et al., 2000). Astrozyten und Neurone können den Liganden IP-10 nach Ischämie sekretieren (Wang et al., 1998). In der Peripherie wird CXCR3 auf Lymphozyten exprimiert und ist wichtig für das Homing dieser Zellen aus den LK (Cervantes-Barragán et al., 2012). CCR7 ist ein Chemokinrezeptor, welcher in Gedächtnis-T-Zellen exprimiert wird (Sallusto et al., 2004) und nach Inflammation im Gehirn auf aktivierten Mikroglia und Astrozyten detektiert werden kann (Gomez-Nicola et al., 2010; Serafini et al., 2006). Erhöhte Mengen CCR7 können in den ersten Tagen nach MCAO im Gehirn und der Peripherie lokalisiert werden (Offner et al., 2005). In der hier vorliegenden Studie waren die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR7 in der post-ischämischen Hemisphäre detektierbar und weitere Studien können zeigen, welche Zellen CXCR3 und CCR7 im Gehirn exprimieren. Insbesondere könnte CXCR3 als wichtiger Faktor für Reorganisationsprozesse im Gehirn durch Mikroglia von Bedeutung sein (Rappert et al., 2004).

Die mRNA der Moleküle DC-LAMP und DC-SIGN wurden am Tag 14 nach MCAO in der ischämischen Hemisphäre detektiert. DC-LAMP ist ein Glykoprotein, welches in den Lysozymen von dendritischen Zellen lokalisiert ist. DC-LAMP wird insbesondere in dendritischen Zellen nach Reifung und Aktivierung hoch reguliert (de Saint-Vis et al., 1998). Nach Multipler Sklerose sind im ZNS reife dendritische Zellen, die positiv für DC-LAMP sind, detektierbar (Serafini et al., 2006). Reife und aktivierte dendritische Zellen induzieren Immunität (Banchereau and Steinman, 1998) und können in der Form einen Einfluss auf die spezifische Aktivierung von Effektor-T-Zellen im Gehirn haben. DC-SIGN, ein C-Typ Lektin, wird von dendritischen Zellen, Makrophagen (van den Berg et al., 2012) und Mikroglia exprimiert (Park et al., 2009). DC-SIGN ist ein Adhäsionsmolekül und bewerkstelligt den Kontakt von dendritischen Zellen zu T-Zellen über ICAM-3 und das Rollen auf Endothelzellen über die Interaktion mit ICAM-2. Zusätzlich hat es eine Rolle bei der Erkennung zahlreicher Mikroorganismen durch dendritische Zellen (Švajger et al., 2010). Die Erkennung von Pathogenen über C-Typ Lektine führt zu der Expression spezifischer Zytokine, welche die Induktion adaptiver T-Zellantworten anweisen (van den Berg et al., 2012). DC-LAMP und DC-SIGN könnten demnach eine Bedeutung für späte inflammatorische Prozesse und T-Zellaktivierung im Gehirn nach Ischämie haben.

ILT3 (oder LILRB4/CD85k) ist ein immunregulatorischer und inhibitorischer Rezeptor, welcher von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird (Cella

et al., 1997). In der Literatur wird ILT3 im Zusammenhang mit Toleranzinduktion diskutiert (Manavalan et al., 2003; Suci-Foca et al., 2005). Insbesondere können dendritische Zellen, welche ILT3 im starken Maße exprimieren, Tregs induzieren (Ge et al., 2012; Manavalan et al., 2003). Interessanterweise wurde nach MCAO die mRNA des ILT3 an allen Zeitpunkten in den lädierten Hemisphären verstärkt exprimiert, wobei am Tag 14 die Expression am stärksten war. Auf zellulärer Ebene wurde die Expression des ILT3 nicht untersucht. Da das ILT3 in der ischämischen Hemisphäre sehr stark exprimiert wurde, wäre in einer weiterführenden Studie interessant zu erfahren, welche Zellen diesen Faktor exprimieren und inwiefern ein Zusammenhang zu der Expansion von Tregs im Gehirn nach MCAO besteht. Insbesondere kann die Frage gestellt werden, ob lokale Mikroglia, bei einer sterilen Inflammation, die nach einer MCAO entsteht, einen tolerogenen Phänotyp annehmen können, denn Mikroglia können *in vitro* nach einer milden Stimulation mit IFN- γ Tregs induzieren (Ebner et al., *submitted*).

4.2.4 Funktionalität CD25⁺ Tregs nach MCAO

Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen einer Depletion der CD25⁺ Tregs auf Infarkt volumina und das Gangverhalten bis zu 27 Tage nach MCAO ermittelt. CD25⁺ Tregs sind eine Gruppe hoch suppressiver CD4⁺ T-Zellen (Sakaguchi et al., 2006). Innerhalb der ersten Woche nach einer MCAO können CD25⁺ Tregs über die Sekretion des Zytokins IL-10 zerebroprotektiv wirken (Liesz et al., 2009a). In der hier vorgelegten Studie wurde drei Tage nach MCAO mit dem Depletionsprotokoll begonnen, um einen späten Einfluss der CD25⁺ Tregs auf funktionelle und neurologische Endpunkte zu ermitteln. Die Injektion des depletierenden Antikörpers wurde am Tag 14 nach MCAO wiederholt, um eine lang anhaltende systemische Wirkung zu erreichen. Eine erfolgreiche Depletion der CD25⁺ Tregs konnte am Tag 9 im Blut nachgewiesen werden und der Anteil CD25⁺ Tregs war am Tag 30 im Blut, zervikalen LK, Milz und im Gehirn weiterhin signifikant vermindert (Abb. 34). Im Gehirn konnten am Tag 30 nach MCAO keine Effekte auf die Aktivierung der Mikroglia und die Verteilung der peripheren Leukozyten am Tag 30 festgestellt werden (Abb. 37). In diesem Fall ist es möglich, dass am Tag 30 im Gehirn, durch den Rückgang der Wirkung des depletierenden Antikörpers, auf zellulärer Ebene im Gehirn keine Auswirkungen auf das Immunsystem mehr festgestellt werden konnten.

Die i.p. Verabreichung des depletierenden Antikörpers anti-CD25 kann in inflammatorischen Modellen zu einer Reduktion der aktivierten CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen führen (Couper et al., 2009). In der gegenwärtigen Studie konnte am Tag 30 nach MCAO eine Reduktion der aktivierten CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen in zervikalen LK und Milz beobachtet werden. Es konnte jedoch keine Reduktion der aktivierten CD4⁺/CD25⁺

T-Zellen in der ischämischen Hemisphären beobachtet werden. Dieser Einfluss des anti-CD25 Antikörpers auf proinflammatorische Komponenten in der Peripherie muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Die Depletion der CD25⁺ Tregs führte zu keinen Veränderungen der Infarktvolumina und des Gangverhaltens im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 35 und Abb. 36). Eine Ursache für die fehlende Wirkung der Depletion auf die Entwicklung des Infarktvolumens könnte mit der Modell-spezifischen Größe der Infarktvolumina zusammenhängen, die in Abhängigkeit von den chirurgischen Parametern, wie Verschlussdauer der MCA und Durchmesser des Fadens zum Verschluss, entstehen. In einer früheren Studie war ein Effekt der CD25⁺ Tregs in Modellen mit einer Infarktgröße um die 15 mm³ detektierbar (Liesz et al., 2009a). In Mäusen mit einer Infarktgröße um die 100 mm³ war kein Einfluss zu erkennen (Liesz et al., 2009a). In einer weiteren Studie, in der spezifisch Foxp3⁺ Tregs, die sowohl CD25⁺ Tregs, als auch CD25⁻ Tregs enthielten, in Mäusen depletiert wurden, konnte weder eine Auswirkung auf die Infarktgröße, die in etwa 50 mm³ betrug, noch auf den funktionellen Endpunkt gesehen werden (Ren et al., 2010). In einer aktuelleren Studie wurde sogar eine Verminderung des Infarktvolumens nach Depletion Foxp3⁺ Tregs beobachtet. In dieser Studie wurde nach Depletion Foxp3⁺ Tregs eine reduzierte Thrombenbildung und verbesserte zerebrale Reperfusion beobachtet (Kleinschnitz et al., 2012). Daraus lässt sich ableiten, dass spezifische Zellen des Immunsystems eine unterschiedliche Relevanz in unterschiedlichen Modellen für Schlaganfall haben. Diese Schlussfolgerung ist bei der Extrapolation von Ergebnissen aus der experimentellen Schlaganfallforschung in klinische Anwendungen relevant.

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Wirkung der Immunzellen im Gehirn ist die Zeit. Der Einfluss von Immunzellen auf die Entwicklung des ischämischen Infarkts im Laufe der Zeit ist ein sehr dynamischer Prozess. Vermutlich kann die protektive Wirkung der Tregs innerhalb der ersten Woche nach MCAO auf eine sog. „*bystander suppression*“ zurückgeführt werden (Liesz et al., 2009a). Diese Form der Suppression durch Tregs erfolgt antigenunspezifisch und wirkt auf Effektor-T-Zellen mit sehr distinkten Antigenspezifitäten (Tang and Bluestone, 2008). Nach Tolerisierung der Versuchstiere mit Gehirnantigenen vor einem ischämischen Infarkt führt die Tregs vermittelte Antwort zu verminderten Infarktgrößen und einer Verbesserung funktioneller Endpunkte (Frenkel et al., 2003; Gee et al., 2008). In den ersten Tagen nach MCAO entsteht zunächst eine unspezifisch ausgerichtete T-Zellantwort, während zu späteren Zeitpunkten in der Peripherie eine spezifische Aktivierung von T-Zellen stattfindet, welche in das Gehirn infiltrieren. Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen jedoch, dass in einem verzögerten Zeitfenster CD25⁺ Tregs nicht relevant für die Limitierung inflammatorischer Prozesse sind, die die funktionelle Erholung nach MCAO

beeinträchtigen. Es könnte sein, dass in dieser späten Phase nach einem Schlaganfall die Funktion der Tregs variiert und vielmehr assoziiert ist mit Reparaturmechanismen wie Narbenbildung, Gewebeumbau und Revaskularisierung des betroffenen Hirnareals (Rolls et al., 2009).

4.3 Ausblick

In dieser Doktorarbeit wurde zum ersten Mal ein immunologischer Prozess entdeckt, der zeitlich getrennt von der ersten Akkumulation lokaler und peripherer Immunzellen im lädierten Hirnareal stattfindet (Stubbe et al., 2013). Die späte Akkumulation von CD4⁺ T-Zellen, Foxp3⁺ Tregs und antigenpräsentierenden Zellen könnte für therapeutische Zwecke, die auf das Immunsystem abzielen, relevant sein. Die Mechanismen zur Toleranzinduktion, die über Tregs und tolerogene Moleküle reguliert werden, sind ein potentiell therapeutisches Ziel zur Prävention vor sekundärer Schädigung und Förderung der Rehabilitation nach einem ischämischen Infarkt oder einer mechanischen Verletzung im Gehirn. Deswegen ist die weitere Erforschung der Spezifität und Funktionalität aktivierter Tregs nach einer ischämischen oder mechanischen Läsion für die klinische Anwendung von Interesse.

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigen, dass die Immunantwort nach Ischämie ein systemischer, dynamischer und langfristiger Vorgang ist. Langfristige Beobachtungen in der experimentellen Schlaganfallforschung sind notwendig, denn neben der akuten sterilen Inflammation nach einer Gehirnischämie, kommt es innerhalb der ersten Tage zu einer systemischen Immundepression. Durch die systemische Immundepression besteht eine erhöhte Gefahr der Entstehung bakterieller Infektionen, wie Pneumonie oder Infektion des Urogenitaltrakts (Klehm et al., 2009; Meisel et al., 2005; Prass et al., 2003; Westendorp et al., 2011). Im Tierversuch führte die Stimulation einer systemischen Inflammation zu einer verstärkten Sensibilisierung gegen das Gehirnantigen MBP und Verschlechterung neurologischer und funktioneller Endpunkte (Becker et al., 2005; Zierath et al., 2009). In einer Patientenstudie konnte eine erhöhte Mortalitätsrate 30 Tage und ein Jahr, jedoch nicht eine Woche, nach Schlaganfall mit Pneumonie festgestellt werden (Finlayson et al., 2011). Für die Extrapolation von Ergebnissen aus der experimentellen Schlaganfallforschung sind langfristige Versuchsansätze gefordert (Mergenthaler and Meisel, 2012). Neben dem Vergleich von Infarktvolumina nach einer therapeutischen Intervention können Untersuchungen, die langfristige funktionelle Endpunkte wie das Gangverhalten beschreiben, die experimentelle Schlaganfallforschung verbessern (Hetze et al., 2012; Mergenthaler and Meisel, 2012).

5 Literatur

- Agrawal, S., Anderson, P., Durbeej, M., Rooijen, N. van, Ivars, F., Opdenakker, G., and Sorokin, L.M. (2006). Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 203, 1007–1019.
- Almolda, B., González, B., and Castellano, B. (2010). Activated microglial cells acquire an immature dendritic cell phenotype and may terminate the immune response in an acute model of EAE. *J Neuroimmunol* 223, 39–54.
- Aloisi, F., Ria, F., and Adorini, L. (2000). Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today* 21, 141–147.
- Altin, J.G., and Sloan, E.K. (1997). The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol* 75, 430–445.
- Ankeny, D.P., Lucin, K.M., Sanders, V.M., McGaughy, V.M., and Popovich, P.G. (2006). Spinal cord injury triggers systemic autoimmunity: evidence for chronic B lymphocyte activation and lupus-like autoantibody synthesis. *J Neurochem* 99, 1073–1087.
- Astrup, J., Siesjö, B.K., and Symon, L. (1981). Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12, 723–725.
- Babcock, A.A., Kuziel, W.A., Rivest, S., and Owens, T. (2003). Chemokine Expression by Glial Cells Directs Leukocytes to Sites of Axonal Injury in the CNS. *J Neurosci* 23, 7922–7930.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252.
- Battaglia, M., Stabilini, A., and Roncarolo, M.-G. (2005). Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 105, 4743–4748.
- Bechmann, I., and Nitsch, R. (1997a). Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: A light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia* 20, 145–154.
- Bechmann, I., and Nitsch, R. (1997b). Identification of phagocytic glial cells after lesion-induced anterograde degeneration using double-fluorescence labeling: combination of axonal tracing and lectin or immunostaining. *Histochem Cell Biol* 107, 391–397.
- Bechmann, I., Mor, G., Nilsen, J., Eliza, M., Nitsch, R., and Naftolin, F. (1999). FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: Evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia* 27, 62–74.
- Bechmann, I., Lossau, S., Steiner, B., Mor, G., Gimsa, U., and Nitsch, R. (2000). Reactive astrocytes upregulate fas (CD95) and fas ligand (CD95L) expression but do not undergo programmed cell death during the course of anterograde degeneration. *Glia* 32, 25–41.

Bechmann, I., Peter, S., Beyer, M., Gimsa, U., and Nitsch, R. (2001). Presence of B7--2 (CD86) and lack of B7--1 (CD80) on myelin phagocytosing MHC-II-positive rat microglia is associated with nondestructive immunity in vivo. *FASEB J* 15, 1086–1088.

Bechmann, I., Goldmann, J., Kovac, A.D., Kwidzinski, E., Simbürger, E., Naftolin, F., Dirnagl, U., Nitsch, R., and Priller, J. (2005). Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. *FASEB J* 19, 647–649.

Bechmann, I., Galea, I., and Perry, V.H. (2007). What is the blood–brain barrier (not)? *Trends Immunol* 28, 5–11.

Becker, K., Kindrick, D., Relton, J., Harlan, J., and Winn, R. (2001). Antibody to the $\alpha 4$ Integrin Decreases Infarct Size in Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Stroke* 32, 206–211.

Becker, K., Kindrick, D., McCarron, R., Hallenbeck, J., and Winn, R. (2003). Adoptive Transfer of Myelin Basic Protein-Tolerized Splenocytes to Naive Animals Reduces Infarct Size: A Role for Lymphocytes in Ischemic Brain Injury? *Stroke* 34, 1809–1815.

Becker, K.J., McCarron, R.M., Ruetzler, C., Laban, O., Sternberg, E., Flanders, K.C., and Hallenbeck, J.M. (1997). Immunologic tolerance to myelin basic protein decreases stroke size after transient focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10873–10878.

Becker, K.J., Kindrick, D.L., Lester, M.P., Shea, C., and Ye, Z.-C. (2005). Sensitization to brain antigens after stroke is augmented by lipopolysaccharide. *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 1634–1644.

Benacerraf, B., and Germain, R.N. (1981). A single major pathway of T-lymphocyte interactions in antigen-specific immune suppression. *Scand J Immunol* 13, 1–10.

Van den Berg, L.M., Gringhuis, S.I., and Geijtenbeek, T.B.H. (2012). An evolutionary perspective on C-type lectins in infection and immunity. *Ann N Y Acad Sci* 1253, 149–158.

Bettelli, E., Pagany, M., Weiner, H.L., Linington, C., Sobel, R.A., and Kuchroo, V.K. (2003). Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-specific T Cell Receptor Transgenic Mice Develop Spontaneous Autoimmune Optic Neuritis. *J Exp Med* 197, 1073–1081.

Biber, K., Sauter, A., Brouwer, N., Copray, S.C.V.M., and Boddeke, H.W.G.M. (2001). Ischemia-induced neuronal expression of the microglia attracting chemokine secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC). *Glia* 34, 121–133.

Bohacek, I., Cordeau, P., Lalancette-Hébert, M., Gorup, D., Weng, Y.-C., Gajovic, S., and Kriz, J. (2012). Toll-like receptor 2 deficiency leads to delayed exacerbation of ischemic injury. *J Neuroinflammation* 9, 191.

Boyman, O., and Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 12, 180–190.

Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paeper, B., Clark, L.B., Yasayko, S.-A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurf mouse. *Nature Genetics* 27, 68–73.

- Bulloch, K., Miller, M.M., Gal-Toth, J., Milner, T.A., Gottfried-Blackmore, A., Waters, E.M., Kaunzner, U.W., Liu, K., Lindquist, R., Nussenzweig, M.C., et al. (2008). CD11c/EYFP transgene illuminates a discrete network of dendritic cells within the embryonic, neonatal, adult, and injured mouse brain. *J Comp Neurol* 508, 687–710.
- Burns, J., Rosenzweig, A., Zweiman, B., and Lisak, R.P. (1983). Isolation of myelin basic protein-reactive T-cell lines from normal human blood. *Cell Immunol* 81, 435–440.
- Burns, J., Krasner, L.J., and Guerrero, F. (1986). Human cellular immune response to copolymer I and myelin basic protein. *Neurology* 36, 92–92.
- Campanella, M., Sciorati, C., Tarozzo, G., and Beltramo, M. (2002). Flow Cytometric Analysis of Inflammatory Cells in Ischemic Rat Brain. *Stroke* 33, 586–592.
- Candelario-Jalil, E., González-Falcón, A., García-Cabrera, M., León, O.S., and Fiebich, B.L. (2007). Post-ischaemic treatment with the cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide reduces blood–brain barrier disruption and leukocyte infiltration following transient focal cerebral ischaemia in rats. *J Neurochem* 100, 1108–1120.
- Carmichael, S.T. (2005). Rodent Models of Focal Stroke: Size, Mechanism, and Purpose. *NeuroRx* 2, 396–409.
- Cella, M., Döhring, C., Samaridis, J., Dessing, M., Brockhaus, M., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1997). A Novel Inhibitory Receptor (ILT3) Expressed on Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells Involved in Antigen Processing. *J Exp Med* 185, 1743–1751.
- Cervantes-Barragán, L., Firner, S., Bechmann, I., Waisman, A., Lahl, K., Sparwasser, T., Thiel, V., and Ludewig, B. (2012). Regulatory T Cells Selectively Preserve Immune Privilege of Self-Antigens during Viral Central Nervous System Infection. *J Immunol* 188, 3678–3685.
- Chamorro, Á., Meisel, A., Planas, A.M., Urra, X., Beek, D. van de, and Veltkamp, R. (2012). The immunology of acute stroke. *Nat Rev Neurol* 8, 401–410.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of Peripheral CD4+CD25– Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *J Exp Med* 198, 1875–1886.
- Chen, X., Hamano, R., Subleski, J.J., Hurwitz, A.A., Howard, O.M.Z., and Oppenheim, J.J. (2010). Expression of Costimulatory TNFR2 Induces Resistance of CD4+FoxP3– Conventional T Cells to Suppression by CD4+FoxP3+ Regulatory T Cells. *J Immunol* 185, 174–182.
- Connolly, E.S., Winfree, C.J., Springer, T.A., Naka, Y., Liao, H., Yan, S.D., Stern, D.M., Solomon, R.A., Gutierrez-Ramos, J.C., and Pinsky, D.J. (1996). Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J Clin Invest* 97, 209–216.
- Coombes, J.L., Siddiqui, K.R.R., Arancibia-Cárcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- β – and retinoic acid–dependent mechanism. *J Exp Med* 204, 1757–1764.

Couper, K.N., Lanthier, P.A., Perona-Wright, G., Kummer, L.W., Chen, W., Smiley, S.T., Mohrs, M., and Johnson, L.L. (2009). Anti-CD25 Antibody-Mediated Depletion of Effector T Cell Populations Enhances Susceptibility of Mice to Acute but Not Chronic *Toxoplasma gondii* Infection. *J Immunol* 182, 3985–3994.

Cserr, H.F., and Knopf, P.M. (1992). Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol Today* 13, 507–512.

Curotto de Lafaille, M.A., Lino, A.C., Kutchukhidze, N., and Lafaille, J.J. (2004). CD25-T Cells Generate CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells by Peripheral Expansion. *J Immunol* 173, 7259–7268.

Davies, C.A., Loddick, S.A., Stroemer, R.P., Hunt, J., and Rothwell, N.J. (1998). An Integrated Analysis of the Progression of Cell Responses Induced by Permanent Focal Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat. *Exp Neurol* 154, 199–212.

Dirnagl, U., Iadecola, C., and Moskowitz, M.A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22, 391–397.

Dirnagl, U., Klehmet, J., Braun, J.S., Harms, H., Meisel, C., Ziemssen, T., Prass, K., and Meisel, A. (2007). Stroke-Induced Immunodepression: Experimental Evidence and Clinical Relevance. *Stroke* 38, 770–773.

Donnan, G.A., Fisher, M., Macleod, M., and Davis, S.M. (2008). Stroke. *The Lancet* 371, 1612–1623.

Ebner F., Brandt C., Thiele P., Richter D., Siffrin V., Schueler J., Stubbe T., Ellinghaus A., Zipp F., Meisel C., Sawitzki B., Nitsch R. (2012). Microglial activation milieu controls regulatory T cell responses. *J Immunol. submitted*.

Emsley, H.C.A., Smith, C.J., Gavin, C.M., Georgiou, R.F., Vail, A., Barberan, E.M., Hallenbeck, J.M., del Zoppo, G.J., Rothwell, N.J., Tyrrell, P.J., et al. (2003). An early and sustained peripheral inflammatory response in acute ischaemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis. *J Neuroimmunol* 139, 93–101.

Engel, O., Kolodziej, S., Dirnagl, U., and Prinz, V. (2011). Modeling Stroke in Mice - Middle Cerebral Artery Occlusion with the Filament Model. *J Vis Exp*.

Engelhardt, B., and Ransohoff, R.M. (2012). Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood–brain barriers. *Trends Immunol* 33, 579–589.

Engelhardt, B., and Sorokin, L. (2009). The blood–brain and the blood–cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol* 31, 497–511.

Eyüpoglu, I.Y., Bechmann, I., and Nitsch, R. (2003). Modification of microglia function protects from lesion-induced neuronal alterations and promotes sprouting in the hippocampus. *FASEB J.* 17, 1110–1111.

Fabbri, M., Smart, C., and Pardi, R. (2003). T lymphocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 1004–1008.

Fagan, A.M., and Gage, F.H. (1990). Cholinergic sprouting in the hippocampus: A proposed role for IL-1. *Exp Neurol* 110, 105–120.

Fagan, A.M., and Gage, F.H. (1994). Mechanisms of sprouting in the adult central nervous system: Cellular responses in areas of terminal degeneration and reinnervation in the rat hippocampus. *Neuroscience* 58, 705–725.

- Fazilleau, N., Delarasse, C., Sweenie, C.H., Anderton, S.M., Fillatreau, S., Lemonnier, F.A., Pham-Dinh, D., and Kanellopoulos, J.M. (2006). Persistence of autoreactive myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-specific T cell repertoires in MOG-expressing mice. *Eur J Immunol* 36, 533–543.
- Fazilleau, N., Delarasse, C., Motta, I., Fillatreau, S., Gougeon, M.-L., Kourilsky, P., Pham-Dinh, D., and Kanellopoulos, J.M. (2007). T Cell Repertoire Diversity Is Required for Relapses in Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* 178, 4865–4875.
- Felger, J.C., Abe, T., Kaunzner, U.W., Gottfried-Blackmore, A., Gal-Toth, J., McEwen, B.S., Iadecola, C., and Bulloch, K. (2010). Brain dendritic cells in ischemic stroke: Time course, activation state, and origin. *Brain Behav Immun* 24, 724–737.
- Finlayson, O., Kapral, M., Hall, R., Asllani, E., Selchen, D., and Saposnik, G. (2011). Risk factors, inpatient care, and outcomes of pneumonia after ischemic stroke. *Neurology* 77, 1338–1345.
- Flügel, A., Berkowicz, T., Ritter, T., Labeur, M., Jenne, D.E., Li, Z., Ellwart, J.W., Willem, M., Lassmann, H., and Wekerle, H. (2001). Migratory Activity and Functional Changes of Green Fluorescent Effector Cells before and during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Immunity* 14, 547–560.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330–336.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Williams, L.M., Dooley, J.L., Farr, A.G., and Rudensky, A.Y. (2005a). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22, 329–341.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2005b). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6, 1142–1151.
- Frenkel, D., Huang, Z., Maron, R., Koldzic, D.N., Hancock, W.W., Moskowitz, M.A., and Weiner, H.L. (2003). Nasal Vaccination with Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Reduces Stroke Size by Inducing IL-10-Producing CD4⁺ T Cells. *J Immunol* 171, 6549–6555.
- Galea, I., Bechmann, I., and Perry, V.H. (2007). What is immune privilege (not)? *Trends Immunol* 28, 12–18.
- Gall, C., Rose, G., and Lynch, G. (1979). Proliferative and migratory activity of glial cells in the partially deafferented hippocampus. *J Comp Neurol* 183, 539–549.
- Garcia, J.H., Liu, K.F., Yoshida, Y., Lian, J., Chen, S., and del Zoppo, G.J. (1994). Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am J Pathol* 144, 188–199.
- Gavin, M.A., Clarke, S.R., Negrou, E., Gallegos, A., and Rudensky, A. (2001). Homeostasis and anergy of CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 3, 33–41.
- Ge, G., Tian, P., Liu, H., Zheng, J., Fan, X., Ding, C., Jin, Z., Luo, X., and Xue, W. (2012). Induction of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T regulatory cells by dendritic cells derived from ILT3 lentivirus-transduced human CD34⁺ Cells. *Transpl Immunol* 26, 19–26.

Gee, J.M., Kalil, A., Shea, C., and Becker, K.J. (2007). Lymphocytes: Potential Mediators of Postischemic Injury and Neuroprotection. *Stroke* 38, 783–788.

Gee, J.M., Kalil, A., Thullbery, M., and Becker, K.J. (2008). Induction of Immunologic Tolerance to Myelin Basic Protein Prevents Central Nervous System Autoimmunity and Improves Outcome After Stroke. *Stroke* 39, 1575–1582.

Gee, J.M., Zierath, D., Hadwin, J., Savos, A., Kalil, A., Thullbery, M., and Becker, K.J. (2009). Long term immunologic consequences of experimental stroke and mucosal tolerance. *Exp Transl Stroke Med* 1, 3–3.

Gelderblom, M., Leyboldt, F., Steinbach, K., Behrens, D., Choe, C.-U., Siler, D.A., Arumugam, T.V., Orthey, E., Gerloff, C., Tolosa, E., et al. (2009). Temporal and Spatial Dynamics of Cerebral Immune Cell Accumulation in Stroke. *Stroke* 40, 1849–1857.

Gendron, A., Teitelbaum, J., Cossette, C., Nuara, S., Dumont, M., Geadah, D., du Souich, P., and Kouassi, E. (2002). Temporal effects of left versus right middle cerebral artery occlusion on spleen lymphocyte subsets and mitogenic response in Wistar rats. *Brain Research* 955, 85–97.

Gerriets, T., Stolz, E., Walberer, M., Muller, C., Kluge, A., Bachmann, A., Fisher, M., Kaps, M., and Bachmann, G. (2004). Noninvasive Quantification of Brain Edema and the Space-Occupying Effect in Rat Stroke Models Using Magnetic Resonance Imaging. *Stroke* 35, 566–571.

Goldberg, S.H., Van Der Meer, P., Hesselgesser, J., Jaffer, S., Kolson, D.L., Albright, A.V., González-Scarano, F., and Lavi, E. (2001). CXCR3 expression in human central nervous system diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27, 127–138.

Gomez-Nicola, D., Pallas-Bazarra, N., Valle-Argos, B., and Nieto-Sampedro, M. (2010). CCR7 is expressed in astrocytes and upregulated after an inflammatory injury. *J Neuroimmunol* 227, 87–92.

Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., Vries, J.E. de, and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4⁺T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737–742.

Guo, F., Iclozan, C., Suh, W.-K., Anasetti, C., and Yu, X.-Z. (2008). CD28 Controls Differentiation of Regulatory T Cells from Naive CD4 T Cells. *J Immunol* 181, 2285 – 2291.

Hailer, N.P., Bechmann, I., Heizmann, S., and Nitsch, R. (1997). Adhesion molecule expression on phagocytic microglial cells following anterograde degeneration of perforant path axons. *Hippocampus* 7, 341–349.

Hailer, N.P., Grampp, A., and Nitsch, R. (1999). Proliferation of microglia and astrocytes in the dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: a quantitative bromodeoxyuridine-labelling study. *Eur J Neurosci* 11, 3359–3364.

Harling-Berg, C.J., Park, J.T., and Knopf, P.M. (1999). Role of the cervical lymphatics in the Th2-type hierarchy of CNS immune regulation. *J Neuroimmunol* 101, 111–127.

Hauben, E., Butovsky, O., Nevo, U., Yoles, E., Moalem, G., Agranov, E., Mor, F., Leibowitz-Amit, R., Pevsner, E., Akseirod, S., et al. (2000). Passive or Active Immunization with Myelin Basic Protein Promotes Recovery from Spinal Cord Contusion. *J Neurosci* 20, 6421–6430.

- Heo, J.H., Lucero, J., Abumiya, T., Koziol, J.A., Copeland, B.R., and del Zoppo, G.J. (1999). Matrix Metalloproteinases Increase Very Early During Experimental Focal Cerebral Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 624–633.
- Hermann, D.M., and Zechariah, A. (2009). Implications of vascular endothelial growth factor for postischemic neurovascular remodeling. *J Cereb Blood Flow Metab* 29, 1620–1643.
- Hetze, S., Römer, C., Teufelhart, C., Meisel, A., and Engel, O. (2012). Gait analysis as a method for assessing neurological outcome in a mouse model of stroke. *J Neurosci Methods* 206, 7–14.
- Hickey, W.F. (2001). Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 36, 118–124.
- Hickey, W.F., and Kimura, H. (1988). Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239, 290–292.
- Hickey, W.F., Hsu, B.L., and Kimura, H. (1991). T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 28, 254–260.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* 299, 1057–1061.
- Hossmann, K.-A. (1994). Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36, 557–565.
- Huehn, J., and Hamann, A. (2005). Homing to suppress: address codes for Treg migration. *Trends Immunol* 26, 632–636.
- Huehn, J., Siegmund, K., Lehmann, J.C.U., Siewert, C., Haubold, U., Feuerer, M., Debes, G.F., Lauber, J., Frey, O., Przybylski, G.K., et al. (2004). Developmental Stage, Phenotype, and Migration Distinguish Naive- and Effector/Memory-like CD4+ Regulatory T Cells. *J Exp Med* 199, 303–313.
- Hugh Perry, V. (1998). A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J Neuroimmunol* 90, 113–121.
- Hurn, P.D., Subramanian, S., Parker, S.M., Afentoulis, M.E., Kaler, L.J., Vandenbark, A.A., and Offner, H. (2007). T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 1798–1805.
- Ito, D., Tanaka, K., Suzuki, S., Dembo, T., and Fukuuchi, Y. (2001). Enhanced Expression of Iba1, Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1, After Transient Focal Cerebral Ischemia In Rat Brain. *Stroke* 32, 1208–1215.
- Jäger, A., and Kuchroo, V.K. (2010). Effector and regulatory T cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scand J Immunol* 72, 173–184.
- Jander, S., Kraemer, M., Schroeter, M., Witte, O.W., and Stoll, G. (1995). Lymphocytic Infiltration and Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 in Photochemically Induced Ischemia of the Rat Cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 15, 42–51.
- Janeway, C., and Murphy, K.P. (2009). *Janeway Immunologie* (Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.), pp. 41–46, 369–371.

- Jensen, M.B., Finsen, B., and Zimmer, J. (1997). Morphological and Immunophenotypic Microglial Changes in the Denervated Fascia Dentata of Adult Rats: Correlation with Blood–Brain Barrier Damage and Astroglial Reactions. *Exp Neurol* 143, 103–116.
- Kaminski, M., Bechmann, I., Pohland, M., Kiwit, J., Nitsch, R., and Glumm, J. (2012). Migration of monocytes after intracerebral injection at entorhinal cortex lesion site. *J Leukoc Biol* 92, 31–39.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., and Jessell, T.M. (2000). Principles of neural science (New York: McGraw-Hill, Health Professions Division), pp. 1232–1233.
- Karandikar, N.J., Vanderlugt, C.L., Bluestone, J.A., and Miller, S.D. (1998). Targeting the B7/CD28:CTLA-4 costimulatory system in CNS autoimmune disease. *J Neuroimmunol* 89, 10–18.
- Klehmet, J., Harms, H., Richter, M., Prass, K., Volk, H.D., Dirnagl, U., Meisel, A., and Meisel, C. (2009). Stroke-induced immunodepression and post-stroke infections: Lessons from the preventive antibacterial therapy in stroke trial. *Neuroscience* 158, 1184–1193.
- Kleinschnitz, C., Schwab, N., Kraft, P., Hagedorn, I., Dreykluft, A., Schwarz, T., Austinat, M., Nieswandt, B., Wiendl, H., and Stoll, G. (2010). Early detrimental T-cell effects in experimental cerebral ischemia are neither related to adaptive immunity nor thrombus formation. *Blood* 115, 3835–3842.
- Kleinschnitz, C., Kraft, P., Dreykluft, A., Hagedorn, I., Göbel, K., Schuhmann, M.K., Langhauser, F., Helluy, X., Schwarz, T., Bittner, S., et al. (2012). Regulatory T cells are strong promoters of acute ischemic stroke in mice by inducing dysfunction of the cerebral microvasculature. *Blood* 121, 679–691.
- Kohm, A.P., Carpentier, P.A., Anger, H.A., and Miller, S.D. (2002). Cutting Edge: CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Antigen-Specific Autoreactive Immune Responses and Central Nervous System Inflammation During Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* 169, 4712–4716.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27, 485–517.
- Kotter, M.R., Li, W.-W., Zhao, C., and Franklin, R.J.M. (2006). Myelin Impairs CNS Remyelination by Inhibiting Oligodendrocyte Precursor Cell Differentiation. *J Neurosci* 26, 328–332.
- Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M.C., and von Boehmer, H. (2005). Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 6, 1219–1227.
- Kumar, P., and Clark, M. (2009). *Clinical Medicine*, p. 1126.
- Kwidzinski, E., Mutlu, L.K., Kovac, A.D., Bunse, J., Goldmann, J., Mahlo, J., Aktas, O., Zipp, F., Kamradt, T., Nitsch, R., et al. (2003). Self-tolerance in the immune privileged CNS: lessons from the entorhinal cortex lesion model. *J Neural Transm Suppl* 29–49.
- Lambertsen, K.L., Meldgaard, M., Ladeby, R., and Finsen, B. (2005). A quantitative study of microglial–macrophage synthesis of tumor necrosis factor during acute and late focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 119–135.

- Laschinger, M., Vajkoczy, P., and Engelhardt, B. (2002). Encephalitogenic T cells use LFA-1 for transendothelial migration but not during capture and initial adhesion strengthening in healthy spinal cord microvessels in vivo. *Eur J Immunol* 32, 3598–3606.
- Lee, Y.J., Jung, K.C., and Park, S.H. (2008). MHC class II-dependent T[ndash]T interactions create a diverse, functional and immunoregulatory reaction circle. *Immunol Cell Biol* 87, 65–71.
- Lehnardt, S., Lehmann, S., Kaul, D., Tschimmel, K., Hoffmann, O., Cho, S., Krueger, C., Nitsch, R., Meisel, A., and Weber, J.R. (2007). Toll-like receptor 2 mediates CNS injury in focal cerebral ischemia. *J Neuroimmunol* 190, 28–33.
- Li, J., Ridgway, W., Fathman, C.G., Tse, H.Y., and Shaw, M.K. (2007). High cell surface expression of CD4 allows distinction of CD4+CD25+ antigen-specific effector T cells from CD4+CD25+ regulatory T cells in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 192, 57–67.
- Liang, S., Alard, P., Zhao, Y., Parnell, S., Clark, S.L., and Kosiewicz, M.M. (2005). Conversion of CD4+ CD25– cells into CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. *J Exp Med* 201, 127–137.
- Liesz, A., Suri-Payer, E., Veltkamp, C., Doerr, H., Sommer, C., Rivest, S., Giese, T., and Veltkamp, R. (2009a). Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med* 15, 192–199.
- Liesz, A., Hagmann, S., Zschoche, C., Adamek, J., Zhou, W., Sun, L., Hug, A., Zorn, M., Dalpke, A., Nawroth, P., et al. (2009b). The Spectrum of Systemic Immune Alterations After Murine Focal Ischemia: Immunodepression Versus Immunomodulation. *Stroke* 40, 2849–2858.
- Lipp, M., Brandt, C., Dehghani, F., Kwidzinski, E., and Bechmann, I. (2007). PD-L1 (B7-H1) regulation in zones of axonal degeneration. *Neurosci Lett* 425, 156–161.
- Liu, Y., Teige, I., Birnir, B., and Issazadeh-Navikas, S. (2006). Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. *Nat Med* 12, 518–525.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408.
- Lotan, M., and Schwartz, M. (1994). Cross talk between the immune system and the nervous system in response to injury: implications for regeneration. *FASEB J* 8, 1026–1033.
- Loubinoux, I., Volk, A., Borredon, J., Guirimand, S., Tiffon, B., Seylaz, J., and Méric, P. (1997). Spreading of Vasogenic Edema and Cytotoxic Edema Assessed by Quantitative Diffusion and T2 Magnetic Resonance Imaging. *Stroke* 28, 419–427.
- Luheshi, N.M., Kovács, K.J., Lopez-Castejon, G., Brough, D., and Denes, A. (2011). Interleukin-1 α expression precedes IL-1 β after ischemic brain injury and is localised to areas of focal neuronal loss and penumbral tissues. *J Neuroinflammation* 8, 186.
- Lynch, G., Matthews, D.A., Mosko, S., Parks, T., and Cotman, C. (1972). Induced acetylcholinesterase-rich layer in rat dentate gyrus following entorhinal lesions. *Brain Research* 42, 311–318.

Ma, M., Wei, T., Boring, L., Charo, I.F., Ransohoff, R.M., and Jakeman, L.B. (2002). Monocyte recruitment and myelin removal are delayed following spinal cord injury in mice with CCR2 chemokine receptor deletion. *J Neurosci Res* 68, 691–702.

Madakamutil, L.T., Maricic, I., Sercarz, E., and Kumar, V. (2003). Regulatory T Cells Control Autoimmunity In Vivo by Inducing Apoptotic Depletion of Activated Pathogenic Lymphocytes. *J Immunol* 170, 2985–2992.

Manavalan, J.S., Rossi, P.C., Vlad, G., Piazza, F., Yarilina, A., Cortesini, R., Mancini, D., and Suci-Foca, N. (2003). High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl Immunol* 11, 245–258.

Marrone, D.F., LeBoutillier, J.C., and Petit, T.L. (2004). Comparative analyses of synaptic densities during reactive synaptogenesis in the rat dentate gyrus. *Brain Research* 996, 19–30.

Matthews, D.A., Cotman, C., and Lynch, G. (1976). An electron microscopic study of lesion-induced synaptogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. I. Magnitude and time course of degeneration. *Brain Research* 115, 1–21.

Matzinger, P. (1994). Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annu Rev Immunol* 12, 991–1045.

Mazzanti, B., Vergelli, M., Riccio, P., Martin, R., McFarland, H.F., Liuzzi, G.M., Amaducci, L., and Massacesi, L. (1998). T-cell response to myelin basic protein and lipid-bound myelin basic protein in patients with multiple sclerosis and healthy donors. *J Neuroimmunol* 82, 96–100.

Medawar, P.B. (1948). Immunity to Homologous Grafted Skin. III. The Fate of Skin Homographs Transplanted to the Brain, to Subcutaneous Tissue, and to the Anterior Chamber of the Eye. *Br J Exp Pathol* 29, 58–69.

Meisel, C., Schwab, J.M., Prass, K., Meisel, A., and Dirnagl, U. (2005). Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci* 6, 775–786.

Mergenthaler, P., and Meisel, A. (2012). Do stroke models model stroke? *Dis Model Mech* 5, 718–725.

Miyara, M., and Sakaguchi, S. (2011). Human FoxP3+CD4+ regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol Cell Biol* 89, 346–351.

Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., et al. (2009). Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity* 30, 899–911.

Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., Yoles, E., Mor, F., Cohen, I.R., and Schwartz, M. (1999). Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med* 5, 49–55.

Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869–877.

Morganti-Kossmann, M.C., Rancan, M., Stahel, P.F., and Kossmann, T. (2002). Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care* 8, 101–105.

- Mumenthaler, M. (2008). *Neurologie: 226 Tabellen* / Marco Mumenthaler; Heinrich Mattle (Stuttgart: Thieme), p. 123.
- Murray, C.J., and Lopez, A.D. (1997). Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *The Lancet* **349**, 1269–1276.
- Mutlu, L., Brandt, C., Kwidzinski, E., Sawitzki, B., Gimsa, U., Mahlo, J., Aktas, O., Nitsch, R., Zwam, M., Laman, J.D., et al. (2006). Tolerogenic effect of fiber tract injury: reduced EAE severity following entorhinal cortex lesion. *Exp Brain Res* **178**, 542–553.
- Nagata, S., and Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* **267**, 1449–1456.
- Napoli, I., and Neumann, H. (2009). Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* **158**, 1030–1038.
- Nedergaard, M., and Dirnagl, U. (2005). Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia* **50**, 281–286.
- Neumann-Haefelin, T., Kastrup, A., de Crespigny, A., Yenari, M.A., Ringer, T., Sun, G.H., Moseley, M.E., and Fisher, M. (2000). Serial MRI After Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats: Dynamics of Tissue Injury, Blood-Brain Barrier Damage, and Edema Formation Editorial Comment: Dynamics of Tissue Injury, Blood-Brain Barrier Damage, and Edema Formation. *Stroke* **31**, 1965–1973.
- Nielsen, H.H., Ladeby, R., Fenger, C., Toft-Hansen, H., Babcock, A.A., Owens, T., and Finsen, B. (2009). Enhanced Microglial Clearance of Myelin Debris in T Cell-Infiltrated Central Nervous System. *J Neuropathol Exp Neurol* **68**, 845–856.
- Nilupul Perera, M., Ma, H.K., Arakawa, S., Howells, D.W., Markus, R., Rowe, C.C., and Donnan, G.A. (2006). Inflammation following stroke. *J Clin Neurosci* **13**, 1–8.
- Ochs, H.D., Ziegler, S.F., and Torgerson, T.R. (2005). FOXP3 acts as a rheostat of the immune response. *Immunol Rev* **203**, 156–164.
- Offner, H., Subramanian, S., Parker, S.M., Afentoulis, M.E., Vandenbark, A.A., and Hurn, P.D. (2005). Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J Cereb Blood Flow Metab* **26**, 654–665.
- Offner, H., Subramanian, S., Parker, S.M., Wang, C., Afentoulis, M.E., Lewis, A., Vandenbark, A.A., and Hurn, P.D. (2006). Splenic Atrophy in Experimental Stroke Is Accompanied by Increased Regulatory T Cells and Circulating Macrophages. *J Immunol* **176**, 6523–6531.
- Olsson, T., Diener, P., Ljungdahl, A., Höjeberg, B., van der Meide, P.H., and Kristensson, K. (1992). Facial nerve transection causes expansion of myelin autoreactive T cells in regional lymph nodes and T cell homing to the facial nucleus. *Autoimmunity* **13**, 117–126.
- Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q., and Li, M.O. (2010). Transforming Growth Factor- β Signaling Curbs Thymic Negative Selection Promoting Regulatory T Cell Development. *Immunity* **32**, 642–653.
- Pál, G., Vincze, C., Renner, É., Wappler, E.A., Nagy, Z., Lovas, G., and Dobolyi, A. (2012). Time Course, Distribution and Cell Types of Induction of Transforming Growth Factor Betas following Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat Brain. *PLoS One* **7**, e46731.

Palmer, E. (2003). Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* 3, 383–391.

Pang, L., Ye, W., Che, X.-M., Roessler, B.J., Betz, A.L., and Yang, G.-Y. (2001). Reduction of Inflammatory Response in the Mouse Brain With Adenoviral-Mediated Transforming Growth Factor- β 1 Expression. *Stroke* 32, 544–552.

Park, J.-Y., Choi, H., Prabagar, M.G.V., Choi, W.-S., Kim, S.-J., Cheong, C., Park, C.G., Chin, C.Y., and Kang, Y.-S. (2009). The C-type lectin CD209b is expressed on microglia and it mediates the uptake of capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*. *Neurosci Lett* 450, 246–251.

Prass, K., Meisel, C., Höflich, C., Braun, J., Halle, E., Wolf, T., Ruscher, K., Victorov, I.V., Priller, J., Dirnagl, U., et al. (2003). Stroke-induced Immunodeficiency Promotes Spontaneous Bacterial Infections and Is Mediated by Sympathetic Activation Reversal by Poststroke T Helper Cell Type 1-like Immunostimulation. *J Exp Med* 198, 725–736.

Prodinger, C., Bunse, J., Krüger, M., Schiefenhövel, F., Brandt, C., Laman, J., Greter, M., Immig, K., Heppner, F., Becher, B., et al. (2011). CD11c-expressing cells reside in the juxtavascular parenchyma and extend processes into the glia limitans of the mouse nervous system. *Acta Neuropathol* 121, 445–458.

Racke, M.K., Scott, D.E., Quigley, L., Gray, G.S., Abe, R., June, C.H., and Perrin, P.J. (1995). Distinct roles for B7-1 (CD-80) and B7-2 (CD-86) in the initiation of experimental allergic encephalomyelitis. *J Clin Invest* 96, 2195–2203.

Rappert, A., Bechmann, I., Pivneva, T., Mahlo, J., Biber, K., Nolte, C., Kovac, A.D., Gerard, C., Boddeke, H.W.G.M., Nitsch, R., et al. (2004). CXCR3-Dependent Microglial Recruitment Is Essential for Dendrite Loss After Brain Lesion. *J Neurosci* 24, 8500–8509.

Relton, J.K., Sloan, K.E., Frew, E.M., Whalley, E.T., Adams, S.P., and Lobb, R.R. (2001). Inhibition of α 4 Integrin Protects Against Transient Focal Cerebral Ischemia in Normotensive and Hypertensive Rats. *Stroke* 32, 199–205.

Ren, X., Akiyoshi, K., Vandenbark, A.A., Hurn, P.D., and Offner, H. (2010). CD4+FoxP3+ regulatory T-cells in cerebral ischemic stroke. *Metab Brain Dis* 26, 87–90.

Rolls, A., Shechter, R., and Schwartz, M. (2009). The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci* 10, 235–241.

Rothwell, N.J., and Luheshi, G.N. (2000). Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci* 23, 618–625.

Royl, G., Balkaya, M., Lehmann, S., Lehnardt, S., Stohlmann, K., Lindauer, U., Endres, M., Dirnagl, U., and Meisel, A. (2009). Effects of the PDE5-inhibitor vardenafil in a mouse stroke model. *Brain Res* 1265, 148–157.

De Saint-Vis, B., Vincent, J., Vandenabeele, S., Vanbervliet, B., Pin, J.-J., Aït-Yahia, S., Patel, S., Mattei, M.-G., Banchereau, J., Zurawski, S., et al. (1998). A Novel Lysosome-Associated Membrane Glycoprotein, DC-LAMP, Induced upon DC Maturation, Is Transiently Expressed in MHC Class II Compartment. *Immunity* 9, 325–336.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains

(CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151–1164.

Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T. (2006). Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 212, 8–27.

Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* 133, 775–787.

Sakaguchi, S., Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., and Yamaguchi, T. (2009). Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 21, 1105 – 1111.

Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annu Rev Immunol* 22, 745–763.

Scheinecker, C., McHugh, R., Shevach, E.M., and Germain, R.N. (2002). Constitutive Presentation of a Natural Tissue Autoantigen Exclusively by Dendritic Cells in the Draining Lymph Node. *J Exp Med* 196, 1079–1090.

Schluesener, H.J., and Wekerle, H. (1984). In vitro selection of permanent T lymphocyte lines with receptors for myelin basic protein (MBP). *Prog Clin Biol Res* 146, 285–290.

Schmerbach, K., Schefe, J.H., Krikov, M., Müller, S., Villringer, A., Kintscher, U., Unger, T., and Thoene-Reineke, C. (2008). Comparison between single and combined treatment with candesartan and pioglitazone following transient focal ischemia in rat brain. *Brain Res* 1208, 225–233.

Scholzen, T., and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Phys* 182, 311–322.

Schwab, M.E. (1990). Myelin-associated inhibitors of neurite growth and regeneration in the CNS. *Trends Neurosci* 13, 452–456.

Schwartz, M. (2003). Control of microglial activity by protective autoimmunity. In *Advances in Molecular and Cell Biology*, Leif Hertz, ed. (Elsevier), pp. 347–365.

Selvaraj, R.K., and Geiger, T.L. (2008). Mitigation of Experimental Allergic Encephalomyelitis by TGF- β Induced Foxp3+ Regulatory T Lymphocytes through the Induction of Anergy and Infectious Tolerance. *J Immunol* 180, 2830–2838.

Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E., Capello, E., Mancardi, G.L., and Aloisi, F. (2006). Dendritic Cells in Multiple Sclerosis Lesions: Maturation Stage, Myelin Uptake, and Interaction With Proliferating T Cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 65, 124–141.

Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* 201, 723–735.

Shevach, E.M., DiPaolo, R.A., Andersson, J., Zhao, D.-M., Stephens, G.L., and Thornton, A.M. (2006). The lifestyle of naturally occurring CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Immunol Rev* 212, 60–73.

Shichita, T., Sugiyama, Y., Ooboshi, H., Sugimori, H., Nakagawa, R., Takada, I., Iwaki, T., Okada, Y., Iida, M., Cua, D.J., et al. (2009). Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing [gamma][delta]T cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med* 15, 946–950.

Shin, H.-J., Baker, J., Leveson-Gower, D.B., Smith, A.T., Sega, E.I., and Negrin, R.S. (2011). Rapamycin and IL-2 reduce lethal acute graft-versus-host disease associated with increased expansion of donor type CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Blood* 118, 2342–2350.

Shirai, Y. (1921). On the transplantation of the rat sarcoma in adult heterogeneous animals. *Jpn Med World* 1, 14–15.

Shrikant, P., and Benveniste, E.N. (1996). The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation. *J Immunol* 157, 1819–1822.

Siebert, H., Sachse, A., Kuziel, W.A., Maeda, N., and Brück, W. (2000). The chemokine receptor CCR2 is involved in macrophage recruitment to the injured peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* 110, 177–185.

Siegmund, K., Feuerer, M., Siewert, C., Ghani, S., Haubold, U., Dankof, A., Krenn, V., Schön, M.P., Scheffold, A., Lowe, J.B., et al. (2005). Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo. *Blood* 106, 3097–3104.

Soares, A., Govender, L., Hughes, J., Mavakla, W., de Kock, M., Barnard, C., Pienaar, B., Janse van Rensburg, E., Jacobs, G., Khomba, G., et al. (2010). Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation. *J Immunol Methods* 362, 43–50.

Soriano, S.G., Coxon, A., Wang, Y.F., Frosch, M.P., Lipton, S.A., Hickey, P.R., and Mayadas, T.N. (1999). Mice Deficient in Mac-1 (CD11b/CD18) Are Less Susceptible to Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Stroke* 30, 134–139.

Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2003). Positive and Negative Selection of T Cells. *Annu Rev Immunol* 21, 139–176.

Steward, O., and Vinsant, S.L. (1983). The process of reinnervation in the dentate gyrus of the adult rat: A quantitative electron microscopic analysis of terminal proliferation and reactive synaptogenesis. *J Comp Neurol* 214, 370–386.

Stoll, G., Jander, S., and Schroeter, M. (1998). Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol* 56, 149–171.

Streilein, J.W. (1995). Unraveling Immune Privilege. *Science* 270, 1158–1159.

Stritesky, G.L., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2012). Selection of Self-Reactive T Cells in the Thymus. *Annu Rev Immunol* 30, 95–114.

Stubbe, T., Ebner, F., Richter, D., Engel, O.R., Klehmet, J., Roysl, G., Meisel, A., Nitsch, R., Meisel, C., and Brandt, C. (2013). Regulatory T cells accumulate and proliferate in the ischemic hemisphere for up to 30 days after MCAO. *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 37–47.

Suciu-Foca, N., Manavalan, J.S., Scotto, L., Kim-Schulze, S., Galluzzo, S., Naiyer, A.J., Fan, J., Vlad, G., and Cortesini, R. (2005). Molecular characterization of

allospecific T suppressor and tolerogenic dendritic cells: review. *Int Immunopharmacol* 5, 7–11.

Švajger, U., Anderluh, M., Jeras, M., and Obermajer, N. (2010). C-type lectin DC-SIGN: An adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cell Signal* 22, 1397–1405.

Tang, Q., and Bluestone, J.A. (2008). The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 9, 239–244.

Taniguchi, T., and Minami, Y. (1993). The IL-2/IL-2 receptor system: A current overview. *Cell* 73, 5–8.

Tarkowski, E., Rosengren, L., Blomstrand, C., Wikkelsö, C., Jensen, C., Ekholm, S., and Tarkowski, A. (1997). Intrathecal release of pro- and anti-inflammatory cytokines during stroke. *Clin Exp Immunol* 110, 492–499.

Tarozzo, G., Campanella, M., Ghiani, M., Bulfone, A., and Beltramo, M. (2002). Expression of fractalkine and its receptor, CX3CR1, in response to ischaemia-reperfusion brain injury in the rat. *Eur J Neurosci* 15, 1663–1668.

Toft-Hansen, H., Buist, R., Sun, X.-J., Schellenberg, A., Peeling, J., and Owens, T. (2006). Metalloproteinases Control Brain Inflammation Induced by Pertussis Toxin in Mice Overexpressing the Chemokine CCL2 in the Central Nervous System. *J Immunol* 177, 7242–7249.

Trajkovic, V., Vuckovic, O., Stosic-Grujicic, S., Miljkovic, D., Popadic, D., Markovic, M., Bumbasirevic, V., Backovic, A., Cvetkovic, I., Harhaji, L., et al. (2004). Astrocyte-induced regulatory T cells mitigate CNS autoimmunity. *Glia* 47, 168–179.

Tran, E.H., Hoekstra, K., Rooijen, N. van, Dijkstra, C.D., and Owens, T. (1998). Immune Invasion of the Central Nervous System Parenchyma and Experimental Allergic Encephalomyelitis, But Not Leukocyte Extravasation from Blood, Are Prevented in Macrophage-Depleted Mice. *J Immunol* 161, 3767–3775.

Vajkoczy, P., Laschinger, M., and Engelhardt, B. (2001). α 4-integrin-VCAM-1 binding mediates G protein-independent capture of encephalitogenic T cell blasts to CNS white matter microvessels. *J Clin Invest* 108, 557–565.

Viganò, S., Perreau, M., Pantaleo, G., and Harari, A. (2012). Positive and Negative Regulation of Cellular Immune Responses in Physiologic Conditions and Diseases. *Clin Dev Immunol* 2012, 1–11.

Wang, Q., Tang, X.N., and Yenari, M.A. (2007). The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 184, 53–68.

Wang, W.Z., Olsson, T., Kostulas, V., Höjeberg, B., Ekre, H.P., and Link, H. (1992). Myelin antigen reactive T cells in cerebrovascular diseases. *Clin Exp Immunol* 88, 157–162.

Wang, X., Ellison, J.A., Siren, A.-L., Lysko, P.G., Yue, T.-L., Barone, F.C., Shatzman, A., and Feuerstein, G.Z. (1998). Prolonged Expression of Interferon-Inducible Protein-10 in Ischemic Cortex After Permanent Occlusion of the Middle Cerebral Artery in Rat. *J Neurochem* 71, 1194–1204.

Wang, X., Li, X., Schmidt, D.B., Foley, J.J., Barone, F.C., Ames, R.S., and Sarau, H.M. (2000). Identification and Molecular Characterization of Rat CXCR3: Receptor

Expression and Interferon-Inducible Protein-10 Binding Are Increased in Focal Stroke. *Mol Pharmacol* 57, 1190–1198.

Wang, Y., Kissenpfennig, A., Mingueneau, M., Richelme, S., Perrin, P., Chevrier, S., Genton, C., Lucas, B., DiSanto, J.P., Acha-Orbea, H., et al. (2008). Th2 Lymphoproliferative Disorder of LatY136F Mutant Mice Unfolds Independently of TCR-MHC Engagement and Is Insensitive to the Action of Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *J Immunol* 180, 1565–1575.

Weaver, C.T., Harrington, L.E., Mangan, P.R., Gavrieli, M., and Murphy, K.M. (2006). Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties. *Immunity* 24, 677–688.

Weiner, H.L. (2001). Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* 3, 947–954.

Westendorp, W., Nederkoorn, P., Vermeij, J.-D., Dijkgraaf, M., and Beek, D. van de (2011). Post-stroke infection: A systematic review and meta-analysis. *BMC Neurology* 11, 110.

Wilfinger, W.W., Mackey, K., and Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 22, 474–476, 478–481.

Wilson, R.K., Lai, E., Concannon, P., Barth, R.K., and Hood, L.E. (1988). Structure, Organization and Polymorphism of Murine and Human T-Cell Receptor α and β Chain Gene Families. *Immunol Rev* 101, 149–172.

Wolburg, H., and Lippoldt, A. (2002). Tight junctions of the blood–brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol* 38, 323–337.

Wolf, S.A., Fisher, J., Bechmann, I., Steiner, B., Kwidzinski, E., and Nitsch, R. (2002). Neuroprotection by T-cells depends on their subtype and activation state. *J Neuroimmunol* 133, 72–80.

Xiong, X., Barreto, G.E., Xu, L., Ouyang, Y.B., Xie, X., and Giffard, R.G. (2011). Increased Brain Injury and Worsened Neurological Outcome in Interleukin-4 Knockout Mice After Transient Focal Cerebral Ischemia. *Stroke* 42, 2026–2032.

Xu, H., Manivannan, A., Liversidge, J., Sharp, P.F., Forrester, J.V., and Crane, I.J. (2003). Requirements for passage of T lymphocytes across non-inflamed retinal microvessels. *J Neuroimmunol* 142, 47–57.

Yamada, S., DePasquale, M., Patlak, C.S., and Cserr, H.F. (1991). Albumin outflow into deep cervical lymph from different regions of rabbit brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 261, H1197–H1204.

Yamazaki, S., Iyoda, T., Tarbell, K., Olson, K., Velinzon, K., Inaba, K., and Steinman, R.M. (2003). Direct Expansion of Functional CD25⁺ CD4⁺ Regulatory T Cells by Antigen-processing Dendritic Cells. *J Exp Med* 198, 235–247.

Yang, Y., and Rosenberg, G.A. (2011). Blood–Brain Barrier Breakdown in Acute and Chronic Cerebrovascular Disease. *Stroke* 42, 3323–3328.

Yenari, M.A., Kunis, D., Sun, G.H., Onley, D., Watson, L., Turner, S., Whitaker, S., and Steinberg, G.K. (1998). Hu23F2G, an Antibody Recognizing the Leukocyte

CD11/CD18 Integrin, Reduces Injury in a Rabbit Model of Transient Focal Cerebral Ischemia. *Exp Neurol* 153, 223–233.

Yilmaz, G., Arumugam, T.V., Stokes, K.Y., and Granger, D.N. (2006). Role of T Lymphocytes and Interferon- γ in Ischemic Stroke. *Circulation* 113, 2105–2112.

Zamvil, S.S., and Steinman, L. (1990). The T Lymphocyte in Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 8, 579–621.

Zhai, Q.-H., Futrell, N., and Chen, F.-J. (1997). Gene expression of IL-10 in relationship to TNF- α , IL-1 β and IL-2 in the rat brain following middle cerebral artery occlusion. *J Neurol Sci* 152, 119–124.

Zhang, Z.G., Zhang, L., Jiang, Q., Zhang, R., Davies, K., Powers, C., Bruggen, N. van, and Chopp, M. (2000). VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest* 106, 829–838.

Zheng, S.G., Wang, J., Wang, P., Gray, J.D., and Horwitz, D.A. (2007). IL-2 Is Essential for TGF- β to Convert Naive CD4+CD25 $^{-}$ Cells to CD25+Foxp3 $^{+}$ Regulatory T Cells and for Expansion of These Cells. *J Immunol* 178, 2018–2027.

Zierath, D., Thullberty, M., Hadwin, J., Gee, J.M., Savos, A., Kalil, A., and Becker, K.J. (2009). CNS Immune Responses Following Experimental Stroke. *Neurocrit Care* 12, 274–284.

Van Zwam, M., Huizinga, R., Melief, M.-J., Wierenga-Wolf, A.F., van Meurs, M., Voerman, J.S., Biber, K.P.H., Boddeke, H.W.G.M., Höpken, U.E., Meisel, C., et al. (2009). Brain antigens in functionally distinct antigen-presenting cell populations in cervical lymph nodes in MS and EAE. *J Mol Med* 87, 273–286.

6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Differenzierung unreifer CD4 ⁺ /CD8 ⁻ Zellen und naiver CD4 ⁺ T-Zellen in regulatorische T-Zellen (Tregs) und Effektor-T-Zellen...	5
Abb. 2: Querschnitt durch eine postkapilläre Venole im Gehirn...	7
Abb. 3: Verbindung der entorhinalen Kortex mit der Hippocampusformation..	10
Abb. 4: Verschluss der mittleren Gehirnarterie.	28
Abb. 5: Bildliche Darstellung der ischämischen Gehirne am MRT mit T2-Gewichtung.	30
Abb. 6: Versuchsübersicht für zwei Versuchsansätze zum Nachweis der <i>de novo</i> Induktion von Tregs nach einer MCAO.	31
Abb. 7: Analyse am Durchflusszytometer zur Sortierung naiver CD4 ⁺ T-Zellen und Ausschluss Foxp3EGFP ⁺ Tregs.....	33
Abb. 8: Analyse am Durchflusszytometer nach Sortierung CD45R/B220 ⁺ B-Zellen aus der Milz.....	34
Abb. 9: Übersicht des Versuchsablaufs zur Untersuchung der Funktionalität CD25 ⁺ Tregs nach MCAO.....	35
Abb. 10: Bildliche Darstellung des Infarktgebiets mit T2-gewichtetem MRT 3 und 27 Tage nach MCAO.....	36
Abb. 11: Auftrennung der Gehirnbestandteile über den Dichtegradienten.....	39
Abb. 12: Analyse CD4 ⁺ T-Zellen und Foxp3EGFP ⁺ Tregs mit dem Durchflusszytometer.	50
Abb. 13: Akkumulation CD4 ⁺ T-Zellen und CD4 ⁺ /Foxp3EGFP ⁺ Tregs im Gehirn nach ECL.	51
Abb. 14: Erhöhter Anteil Foxp3EGFP ⁺ Tregs in % der CD4 ⁺ T-Zellen nach einer ECL.	52
Abb. 15: Immunhistochemischer Nachweis EGFP ⁺ Tregs und Iba1 ⁺ /MHCII ⁺ Zellen nach ECL im Gehirn.....	53
Abb. 16: Akkumulation CD4 ⁺ T-Zellen und Foxp3 ⁺ Tregs in der ischämischen Hemisphäre.	55
Abb. 17: Prozentualer Anteil Foxp3 ⁺ Tregs in den lymphatischen Organen und Blut und die Verteilung CD25 ⁺ /Foxp3 ⁺ Tregs nach MCAO.....	56
Abb. 18: Aktivierte CD4 ⁺ T-Zellen nach MCAO im Gehirn.	57
Abb. 19: Ki-67 als Proliferationsmarker für die Analyse der CD4 ⁺ T-Zellen nach MCAO im Gehirn, LK, Milz und Blut.....	59

Abb. 20: Prozentualer Anteil Ki-67 ⁺ Zellen in zervikalen LK, inguinalen LK, Milz und Blut von Mäusen mit MCAO und Sham-Kontrolle.....	60
Abb. 21: Verminderte Anzahl CD4 ⁺ T-Zellen in inguinalen LK und Milz 14 Tage nach MCAO.	61
Abb. 22: Veränderte Vβ-TCR auf CD4 ⁺ T-Zellen und Foxp3EGFP ⁺ Tregs nach MCAO im Gehirn.	62
Abb. 23: Analyse der transferierten CD4 ⁺ T-Zellen auf FoxpEGFP ⁺ Tregs 14 Tage nach MCAO.....	64
Abb. 24: Immunhistochemischer Nachweis der CD4 ⁺ Zellen und CD4 ⁺ /Foxp3EGFP ⁺ Tregs nach MCAO im Gehirn von Foxp3EGFP Reporter-mäusen.	65
Abb. 25: Foxp3EGFP ⁺ Tregs während der Zellteilung (Pfeilspitze) im Infarktgebiet.....	66
Abb. 26: Analyse der Mikroglia, dendritischen Zellen und Makrophagen mit dem Durchflusszytometer nach MCAO.....	67
Abb. 27: Repräsentative Dotplots von isolierten Zellen aus dem Gehirn 7, 14 und 30 Tage nach MCAO.	68
Abb. 28: Akkumulation der Mikroglia und MHCII ⁺ Mikroglia in der ischämischen Hemisphäre.....	69
Abb. 29: Akkumulation der Makrophagen und dendritischen Zellen in der ischämischen Hemisphäre.....	70
Abb. 30: Immunhistochemischer Nachweis dendritischer Zellen im Infarktgebiet nach MCAO.	71
Abb. 31: Immunhistochemischer Nachweis Iba1 ⁺ monozytärer Immunzellen.	72
Abb. 32: Genexpression diverser Moleküle nach MCAO im Gehirn.	74
Abb. 33: Expression der IL-2 mRNA in ischämischen Hemisphären.	75
Abb. 34: Durchflusszytometrische Analyse der Foxp3EGFP ⁺ /CD25 ⁺ Tregs 9 und 30 Tage nach MCAO....	76
Abb. 35: Mit dem MRT ermittelte Läsionsvolumen (LV) nach MCAO.	77
Abb. 36: Die analysierten Parameter der Ganganalyse der anti-CD25 (-) Gruppe wurden mit der Isotypkontrolle (+) verglichen.	79
Abb. 37: Durchflusszytometrische Analyse der Zellsuspensionen aus ischämischen Hemisphären 30 Tage nach MCAO.	80
Abb. 38: Durchflusszytometrische Analyse der aktivierten CD4 ⁺ T-Zellen in der anti-CD25 Gruppe und der Isotypkontrolle.....	81

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Von Firmen erworbene Substanzen und Chemikalien	19
Tabelle 2: Im Labor hergestellte Lösungen.	20
Tabelle 3: Sonstige Laborutensilien	21
Tabelle 4: Für molekular- und zellbiologische Methoden verwendete <i>Kits</i>	21
Tabelle 5: Labor- und Messgeräte nach Bezeichnung alphabetisch sortiert.....	21
Tabelle 6: Geräte, Substanzen und chirurgisches Werkzeug für ECL, MCAO, MRT- Messung und Organentnahme.....	22
Tabelle 7: In der Durchflusszytometrie verwendete Antikörper.....	24
Tabelle 8: In der Immunhistochemie verwendete Primärantikörper.	25
Tabelle 9: In der Immunhistochemie verwendete Sekundärantikörper und Marker	25
Tabelle 10: Programme.....	26
Tabelle 11: Produktdaten des Antikörpers gegen CD25 und des Isotyps zur Untersuchung der Funktionalität CD25 ⁺ Tregs.	35
Tabelle 12: Auflistung der Antikörper-Mixe und Mäusestämme für Versuche in denen Messungen am Durchflusszytometer durchgeführt wurden.	41
Tabelle 13: Von Applied Biosystems erworbene „TaqMan Gene expression assays“. 47	
Tabelle 14: Pipettiervolumen der Reagenzien für die Real-Time PCR bei einer einfachen Messung.	47

7 Anhang

7.1 Danksagung

Ich danke ganz besonders Christine Brandt für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und für die exzellente Leitung dieses sehr interessanten Forschungsprojekts. Ich bin ihr sehr dankbar dafür, dass ich fachlich und methodisch sehr viel in dieser Zeit lernen konnte und bei der Umsetzung des Projekts und dem Verfassen der Dissertation stets gefördert wurde. Prof. Robert Nitsch möchte ich dafür danken, dass ich dieses spannende Projekt im Institut für Zell- und Neurobiologie unter ausgezeichneten Bedingungen bearbeiten durfte.

Ich danke Daniel Richter für die große Hilfe bei den zahlreichen experimentellen Arbeiten im Labor im Laufe des gesamten Projekts. Ein großer Dank geht auch an Friederike Ebner für die sehr konstruktive Zusammenarbeit und die fachlichen Diskussionen. Bei Peggy Thiele möchte ich mich für die Unterstützung bei zahlreichen Arbeiten im Labor bedanken. Jan Csupor danke ich für die Einweisung in die ECL und der anhaltenden Hilfe mit dieser Methode. Jutta Schüler möchte ich für die hervorragende Hilfe an den zahlreichen Mikroskopen der Anatomie danken. Ich danke auch Ari Liebowsky für die hilfreichen Korrekturlesungen der englischen Texte. Ferner möchte ich den vielen Kolleginnen und Kollegen aus dem Institut für Zell- und Neurobiologie danken, die ein produktives Arbeiten mit einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre ermöglicht haben und mir bei dem Projekt in vielfältiger Weise ausgeholfen haben.

Für die Begutachtung dieser Dissertation möchte ich mich bei Prof. Hans-Dieter Volk, Prof. Birgit Sawitzki und Prof. Andreas Meisel bedanken. Ich möchte mich auch bei allen bedanken, die durch Kooperationen bei der Verwirklichung dieses Projekts sehr geholfen haben. Hierfür danke ich besonders Christian Meisel, Prof. Andreas Meisel, Odilo Engel und Juliane Klehmet für die zahlreichen Meetings, konstruktiven Ideen und fachlichen Auseinandersetzungen, sowie der großartigen Unterstützung bei der Untersuchung der Wirkung von Tregs nach MCAO. Georg Roysl danke ich für die große Hilfe bei der Analyse am MRT zu späten Zeitpunkten nach MCAO. Bei Ulrike Steckelings, Kristin Lucht und Pawel Namsolleck bedanke ich mich sehr für die hervorragende Unterstützung bei der Durchführung der MCAO. Diese Unterstützung hat das ganze Projekt mit der MCAO gewaltig vorangetrieben. Bei Susanne Müller bedanke ich mich für die hervorragende Unterstützung bei der MRT-Analyse.

Meine Eltern haben mich stets auf meinem Lebensweg in vielfältiger Weise unterstützt, wofür ich ihnen sehr danke. Ich danke ihnen herzlichst für den immerwährenden Rückhalt und den starken Zusammenhalt.

Es war die Suche nach regulatorischen T-Zellen, die mich nach Berlin brachte und ich durfte noch viel mehr finden. Ganz herzlich und innig danke ich meiner wunderbaren Ehefrau Yinth für ihre Liebe, ihr warmes Herz und für den großartigen fachlichen Beistand.

Publikationen und Postervorträge

7.1.1 Publikationen

Stubbe T., Ebner F., Richter D., Engel O., Klehmet J., Roysl G., Meisel A., Nitsch R., Meisel C., Brandt C. (2013). Regulatory T cells accumulate and proliferate in the ischemic hemisphere for up to 30 days after MCAO. *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 37-47.

Ebner F., Brandt C., Thiele P., Richter D., Siffrin V., Schueler J., Stubbe T., Ellinghaus A., Zipp F., Meisel C., Sawitzki B., Nitsch R. (2012). Microglial activation milieu controls regulatory T cell responses. *J Immunol. in revision*.

7.1.2 Postervorträge

Stubbe T., Richter D., Meisel C., Nitsch R., Brandt C. (2010). Strong infiltration of regulatory T cells (Treg) into the CNS 14 days after entorhinal cortex lesion (ECL) and middle cerebral artery occlusion (MCAO). 7th FENS Forum of European Neuroscience (*FENS 2010 Amsterdam*).

Stubbe T., Richter D., Meisel C., Nitsch R., Brandt C. (2010). Strong infiltration of regulatory T cells (Treg) into the CNS 14 days after entorhinal cortex lesion (ECL) and middle cerebral artery occlusion (MCAO). Berlin Neuroscience Forum 2010 (*BNF 2010 Liebenwalde*).

Stubbe T., Richter D., Meisel C., Nitsch R., Brandt C. (2009). Infiltration of regulatory T cells (Tregs) in the brain after traumatic injury. 2nd European Congress of Immunology (*ECI 2009 Berlin*).

Stubbe T., Richter D., Meisel C., Nitsch R., Brandt C. (2009). Infiltration of regulatory T cells (Tregs) in the brain after traumatic injury. 20th European Student's Conference (*ESC 2009 Berlin*).

Brandt C., Meisel C., Richter D., Ellinghaus A., Stubbe T., Rolle F., Bechmann I., Nitsch R. (2008). Mechanisms and functional role of immune response following axonal lesion. Berlin Neuroscience Forum 2008 (*BNF 2008 Liebenwalde*).

Berlin, den

7.2 Lebenslauf

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Dissertation mit dem Titel „Lokalisierung und Charakterisierung Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen bis zu 30 Tage nach mechanischer und ischämischer Läsion des Gehirns“ selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen und zulässigen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe mich nicht anderwärts um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Doktorgrad. Die für dieses Promotionsverfahren gültige Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin habe ich zur Kenntnis genommen.

Berlin, den